

# Das mitochondriale Proteom von *Rattus norvegicus* in Abhängigkeit von Alter und Kalorienrestriktion

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)  
vorgelegte Dissertation von Dipl.-Biol. Sandra Cornelia Thilmany aus Offenbach am Main



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Fachbereich Chemie  
AK Prof. Dr. N. A. Dencher



---

**Das mitochondriale Proteom von *Rattus norvegicus* in Abhängigkeit  
von Alter und Kalorienrestriktion**

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte

**Dissertation**

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Sandra Cornelia Thilmany  
aus Offenbach am Main

Referent:	Prof. Dr. Norbert A. Dencher
Korreferent:	Prof. Dr. Gerhard Thiel
Tag der Einreichung:	13. März 2013
Tag der mündlichen Prüfung:	29. April 2013

Darmstadt 2013

**D17**

---





---

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Norbert A. Dencher in der Zeit von Mai 2008 bis März 2013 im Fachbereich Chemie am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt angefertigt.

---



---

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

## Posterpräsentationen

S. Thilmany, S. Goto & N. A. Dencher

*Effects of calorie restriction on the mitochondrial proteome of rat heart.*

MiMage Conference, "Mitochondria in Ageing and Age-related Disease", 26. bis 30. September 2009, Les Diablerets, Schweiz, Tagungsband Seite 42.

S. Thilmany, S. Goto & N. A. Dencher

*Effects of calorie restriction on the mitochondrial proteome of rat heart.*

Doktorandenworkshop der Technischen Universität Darmstadt, 16. Dezember 2009, Darmstadt.

S. Thilmany, S. Goto, M. Sugawa & N. A. Dencher

*Ageing and calorie restriction effect the mitochondrial proteome of rat heart.*

61. Mosbacher Kolloquium "The Biology of Aging: Mechanisms and Intervention", 8. bis 10. April 2010, Mosbach / Baden, Tagungsband Seite 39.

S. Thilmany, M. Saager, H. Seelert, M. Söhn, S. Goto, M. Sugawa & N. A. Dencher

*Ageing and calorie restriction effect the mitochondrial proteome and lipidome of rat heart and brain.*

The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine and The 10th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, 16. bis 18. Dezember 2010, Fukuoka, Japan, Tagungsband Seite 108

N. A. Dencher, M. Frenzel, M. Kratochwil, M. Muschol, E. R. Schäfer, S. Thilmany, S. Goto, H. D. Osiewicz, I. Shimokawa & M. D. Sugawa

*Evolutionary conserved alterations by age and calorie restriction of the organization and performance of the respiratory chain.*

The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, "Digital Ageing: A New Horizon for Health Care and Active Ageing", 23. bis 27. Juni 2013, Seoul, Südkorea (Poster in Vorbereitung).

## Publikation

S. Thilmany, S. Goto, M. D. Sugawa & N. A. Dencher

*Effect of age and calorie restriction on the protein and activity profile of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat heart.*

(Manuskript in Vorbereitung)

---



---

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Norbert A. Dencher für die freundliche Aufnahme als Doktorandin in seine Arbeitsgruppe und die Betreuung meiner Arbeit mit den vielfältigen und stets anregenden Diskussionen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Thiel danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Herrn Prof. Dr. Sataro Goto aus Japan, der alle Gewebeproben bereitgestellt hat, die ich in meiner Arbeit untersucht habe.

In meiner Zeit als Mitglied der Arbeitsgruppe habe ich viele nette Kollegen und Kolleginnen kennen und leider auch gehen sehen. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle gerne Monika Frenzel, Nicolas Heidrich und Eva Schäfer. Durch euch wurden der Laboralltag, Konferenzen und die Büroarbeit noch etwas bunter, lustiger und menschlicher. Wir waren ein tolles Team und ich hoffe inständig, dass wir noch lange in Kontakt bleiben und selbst Ländergrenzen oder volle Windeln uns nicht auf Dauer trennen können. Vielen Dank auch an Dr. Holger Seelert, der eigentlich immer eine Antwort und meistens auch ein passendes Paper zu jeder fachlichen Frage parat hatte, sowie an Manuela Kratochwil, die mit ihrer 'typisch australischen' Gelassenheit dafür sorgte, dass die erlittenen Rückschläge nicht ganz so hart waren, wie sie anfangs schienen. Bei Lidija Cavlovic, Sven Marx, Michael Muschol, Victoria Decker, Michaela Söhn, Maria Saager, Felix Bloeck und bei so vielen weiteren Personen, die im Laufe meiner Promotionszeit das tolle Arbeitsklima im Labor geprägt haben und nicht alle namentlich genannt werden können, möchte ich mich auch ganz herzlich bedanken.

Gerda Zeising, Michaela Fröhlich und Sabine Reinhold danke ich für die Unterstützung bei administrativen Tätigkeiten. Ein spezieller Dank geht an Elizabeth Trapp für ihre Funktion als gute Seele der gesamten Arbeitsgruppe.

Liebe Stephanie, lieber Philipp, ich danke euch von ganzem Herzen für eure langjährige Freundschaft und die aufmunternden Durchhalteparolen während des Schreibens dieser Arbeit. Denkt dran: Göttingen ist nur eine Zwischenstation und ich freue mich heute schon auf eure Rückkehr!

Mein Schatz Micha, der allergrößte Dank gebührt dir für deine nicht enden wollende Unterstützung und Motivation während der gesamten Promotionsphase und für die praktische Hilfe an allen Ecken und Enden.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich mal mehr und manchmal auch weniger wissbegierig auf meinem Weg durch das Studium und die Promotionszeit begleitet haben.

---



---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
2.1 Die mitochondriale Theorie des Alterns .....	5
2.2 Kalorienrestriktion – ein Schluck aus dem Jungbrunnen?.....	7
2.3 Das Herz – ein besonderes Organ .....	10
2.4 Motivation.....	11
<b>3 Materialien.....</b>	<b>12</b>
3.1 Chemikalien .....	12
3.2 Geräte .....	14
3.3 Verbrauchsmaterialien.....	15
3.4 Software .....	16
3.5 Proben .....	17
3.5.1 Herz- und Hirnproben aus <i>Rattus norvegicus</i> .....	17
3.5.2 Leberproben aus <i>Rattus norvegicus</i> .....	18
3.5.3 Rinderherz .....	20
<b>4 Methoden .....</b>	<b>21</b>
4.1 Isolierung von Mitochondrien aus Gewebe .....	21
4.1.1 Isolierung der Mitochondrien aus Rinderherz .....	21
4.1.2 Isolierung der Mitochondrien aus Rattenleber .....	22
4.1.3 Isolierung der Mitochondrien aus Rattenherz .....	23
4.1.3.1 Isolierung der subsarcolemmalen Mitochondrien .....	24
4.1.3.2 Isolierung der interfibrillären Mitochondrien .....	25
4.1.4 Isolierung der Mitochondrien aus Rattenhirn .....	26
4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	26
4.3 Solubilisierung mitochondrialer Membranproteine .....	27
4.4 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	28
4.4.1 Glycin-SDS-PAGE .....	28
4.4.2 Blau-native PAGE .....	30
4.4.3 2D-Tricin-SDS-PAGE.....	30
4.5 Gelfärbemethoden.....	31
4.5.1 Roti®-Blue-Färbung .....	31
4.5.2 SYPRO® Ruby-Färbung.....	32
4.5.3 Silberfärbung .....	32
4.6 In-Gel-Aktivitätstests.....	32
4.6.1 Aktivitätstest für Komplex I.....	33
4.6.2 Aktivitätstest für Komplex IV .....	33
4.7 OxyBlot.....	34
4.7.1 Probenvorbereitung .....	34
4.7.2 Blotting und Antikörper-Behandlung.....	35

4.7.3	Chemilumineszenz-Detektion.....	36
4.7.4	Stripping der Blotmembran.....	37
4.7.5	Detektion mit Alkalischer Phosphatase .....	37
4.8	Quantifizierung von Proteinen.....	38
4.8.1	Quantifizierung mittels Quantity One.....	38
4.8.2	Quantifizierung mittels Delta2D.....	39
4.9	Normierung.....	40
4.9.1	Normierung der Proteinkonzentration.....	40
4.9.2	Normierung der 2D-Gele.....	40
4.9.2.1	Normierung über die Markerbanden .....	40
4.9.2.2	Normierung über die Proteinmenge der Solubilisate .....	41
4.9.2.3	Normierung über die Gesamtsumme aller Proteinspots.....	41
4.9.3	Normierung der Aktivitätstests .....	42
4.10	Statistische Auswertung .....	42
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
5.1	Effekt des Anti-Oxidantien-Cocktails SCAVEGR™.....	44
5.2	Vergleich von Aktivitätstestlösungen für Komplex I.....	52
5.3	Effekt von Nagarse und deren Inhibitoren bei der Gelelektrophorese .....	55
5.4	Quantitative <i>In-Gel</i> -Aktivitätstests.....	64
5.4.1	Subsarcolemmale Mitochondrien aus Rattenherz .....	64
5.4.1.1	Aktivität von Komplex I.....	64
5.4.1.2	Aktivität von Komplex IV.....	71
5.4.2	Interfibrilläre Mitochondrien aus Rattenherz .....	78
5.4.2.1	Aktivität von Komplex I.....	78
5.4.2.2	Aktivität von Komplex IV.....	84
5.5	Quantitative Analyse des mitochondrialen Proteoms .....	91
5.5.1	Subsarcolemmale Mitochondrien aus Herz .....	91
5.5.1.1	ATP-Synthase .....	92
5.5.1.2	Individuelle Komplexe .....	107
5.5.1.3	Superkomplexe.....	120
5.5.1.4	Nicht-OxPhos-Proteine.....	134
5.5.2	Interfibrilläre Mitochondrien aus Herz .....	142
5.5.2.1	ATP-Synthase .....	144
5.5.2.2	Individuelle Komplexe und Superkomplex b .....	151
5.5.2.3	Nicht-OxPhos-Proteine.....	156
5.5.3	Hirn .....	158
5.5.3.1	ATP-Synthase .....	159
5.5.3.2	Individuelle Komplexe .....	164
5.5.3.3	Superkomplexe.....	168
5.5.3.4	Nicht-OxPhos-Proteine.....	173
5.5.4	Leber .....	174
5.5.4.1	ATP-Synthase .....	177
5.5.4.2	Individuelle Komplexe .....	182
5.5.4.3	Superkomplexe.....	185
5.5.4.4	Nicht-OxPhos-Proteine.....	190



---

<b>6 Diskussion .....</b>	<b>194</b>
6.1 Quantitative <i>In-Gel</i> -Aktivitätstests.....	194
6.2 Quantitative Analyse des mitochondrialen Proteoms.....	199
6.2.1 Mitochondrien aus Herz .....	199
6.2.2 Mitochondrien aus Hirn .....	210
6.2.3 Mitochondrien aus Leber.....	214
<b>7 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>220</b>
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>222</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>234</b>



---

## 1 Zusammenfassung

---

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Analyse der Auswirkungen des Alterns und der Kalorienrestriktion auf das mitochondriale Proteom von *Rattus norvegicus*. Bei einer Kalorienrestriktion handelt es sich um die reduzierte Aufnahme von Energie in Form von Nahrung, von der mittlerweile bekannt ist, dass sie das Leben zahlreicher Organismen, unter anderem auch das der Ratte, verlängern und das Auftreten alternsassoziierter Krankheiten vermindern kann.

Der Schwerpunkt der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse der Gewebe Herz, Hirn und Leber lag auf der Detektion von Veränderungen der membranständigen Atmungskettenkomplexe und Superkomplexe, aber es wurden auch einige andere mitochondriale Proteine untersucht. Hierzu wurde eine Methodik verwendet, die eine 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), die Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby und die Quantifizierung mittels der Software Delta2D miteinander kombiniert. Um Proteinkomplexe und Superkomplexe nicht zu zerstören, wurde in der ersten Dimension der 2D-Gelelektrophorese eine blau-native (BN) Auftrennung der Proteinkomplexe gewählt. Die Vorteile der BN-PAGE, neben Protein-Protein-Interaktionen auch die Aktivität der aufgetrennten Proteine zu bewahren, wurden genutzt, um *In-Gel*-Aktivitätstests der Atmungskettenkomplexe I und IV an den aus Herz isolierten Mitochondrien durchzuführen.

Das untersuchte Herzgewebe stammte aus männlichen Fischer-Ratten mit einem Alter von 6,5 und 27 Monaten, die in beiden Altersstufen entweder *ad libitum* (AL) gefüttert wurden, d.h. die Nahrungsaufnahme erfolgte uneingeschränkt, oder ab einem Alter von 6 Wochen einer Kalorienrestriktion (CR) von 40% unterzogen wurden, was eine Lebensverlängerung in Kontrolltieren bewirkte. Daraus ergaben sich vier physiologisch verschiedene Gruppen, für die bei den jungen Tieren (YAL und YCR) jeweils fünf und bei den alten Tieren (OAL und OCR) jeweils sechs Individuen zur Verfügung standen. Die Besonderheit von Herzmuskelgewebe besteht in dem Vorkommen zweier distinkter Mitochondrienspezies, die aufgrund ihrer Lokalisation in den Zellen als subsarcolemmale und interfibrilläre Mitochondrien bezeichnet werden. Durch die Zugabe einer bakteriellen Protease war es möglich, beide Spezies getrennt voneinander zu isolieren, jedoch musste aufgrund der sehr geringen Ausbeute der interfibrillären Mitochondrien ein Probenpool für die geplanten Analysen angelegt werden. Es zeigte sich, dass sich die zugegebene Protease bei der Isolierung der interfibrillären Mitochondrien durch differentielle Zentrifugation nicht vollständig aus der Suspension entfernen ließ und während der SDS-Gelelektrophorese trotz der denaturie-

---

renden Bedingungen Aktivität zeigte und mitochondriale Proteine verdaute. Bei der BN-PAGE traten unerwarteterweise keine Degradationseffekte auf und selbst die Aktivität der Atmungskettenkomplexe wurde durch die Protease nicht beeinträchtigt. Durch die Zugabe des Serin-Protease-Inhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) konnte der Verdau der Proteine durch die Protease während der SDS-PAGE zum größten Teil verhindert werden.

Der Quantifizierung der Proteine lag bei den subsarcolemmalen Mitochondrien eine Gelanzahl von 44 zugrunde, während von den Probenpools der interfibrillären Mitochondrien 8 Gele angefertigt wurden. Für beide Mitochondrienspezies wurden alternsbedingte Mengenzunahmen der ATP-Synthase (Komplex V) von 8% für die subsarcolemmalen und 26% für die interfibrillären Mitochondrien detektiert. Bei den subsarcolemmalen Mitochondrien konnten Erhöhungen der Proteinmengen der individuellen Komplexe I und III<sub>2</sub> infolge des Alterns beobachtet werden, ebenso wie für die Superkomplexe III<sub>2</sub>IV, I<sub>1</sub>IV<sub>1</sub>, c (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>) und d (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>3</sub>). Einzig für die beiden Superkomplexe a (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>) und b (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>) wurden jeweils alternsabhängige Mengenabnahmen detektiert. Die interfibrillären Mitochondrien zeigten hingegen Mengenabnahmen der individuellen Komplexe I, III<sub>2</sub> und IV aufgrund des Alterns, während der einzige quantifizierte Superkomplex (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV) keine Mengenänderung aufwies. Eine Kalorienrestriktion verursachte in den subsarcolemmalen Mitochondrien der jungen Tiere zum größten Teil Mengenzunahmen bei den untersuchten Atmungskettenkomplexen und Superkomplexen, während bei den alten Tieren häufig eine CR-bedingte Verminderung der Proteinmenge detektiert wurde. Es konnte aufgrund der Kalorienrestriktion teilweise eine Kompensation der alternsbedingten Veränderungen beobachtet werden, allerdings zeigten sich teils auch Verstärkungen der Alternseffekte. In den interfibrillären Mitochondrien wurden sowohl für die jungen als auch für die alten Tiere nahezu die gleichen Veränderungen der Proteinmenge aufgrund der Kalorienrestriktion beobachtet. Dabei handelte es sich um eine Zunahme der ATP-Synthase-Menge und eine Abnahme der Menge von Komplex III<sub>2</sub>, während die Komplexe I und IV keine Veränderungen aufwiesen.

Die bei beiden Mitochondrienspezies durchgeführten *In-Gel*-Aktivitätstests für Komplex I und IV zeigten, dass die individuellen Komplexe meist die geringste relative spezifische Aktivität aufwiesen im Vergleich zu den Superkomplexen. So konnte für Komplex I in den interfibrillären Mitochondrien eine bis zu 6-fach höhere Aktivität gemessen werden, wenn dieser mit anderen Atmungskettenkomplexen zu Superkomplexen assoziiert vorlag. Bei den subsarcolemmalen Mitochondrien ergaben sich für Komplex I und dessen Superkomplexe die gleichen Tendenzen aufgrund von Altern und Kalorienrestriktion wie für Komplex IV. Für die interfibrillären Mitochondrien wurde nur bei der OCR-Gruppe eine Veränderung der Aktivitäten detektiert, die sich für Komplex I und dessen Superkomplexe in einer Aktivitäts-

---

abnahme äußerte, während bei Komplex IV und dessen Superkomplexen eine Zunahme infolge der Kalorienrestriktion detektiert wurde.

Bei dem untersuchten Hirngewebe handelte es sich um das Cerebrum, auch Großhirn genannt, das denselben Tieren entnommen wurde, aus denen auch das in der vorliegenden Arbeit analysierte Herzgewebe stammte. Demnach standen für die Proteomanalyse wie für das Herzgewebe jeweils fünf Individuen für die jungen Tiere und sechs Individuen für die alten Tiere zur Verfügung. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte ebenfalls auf der Grundlage von 44 Gelen.

Die Analyse ergab eine Abnahme der Gesamtmenge der ATP-Synthase mit dem Alter sowie eine Verdopplung des Anteils des freien  $F_1$ -Teils der ATP-Synthase. Des Weiteren wurden Mengenzunahmen der individuellen Komplexe I und  $III_2$ , sowie von Superkomplex c detektiert. Eine Kalorienrestriktion resultierte bei beiden Altersstufen in teilweise sehr hohen Abnahmen der Proteinmenge nahezu aller detektierten Komplexe und Superkomplexe.

Das Lebergewebe stammte aus männlichen Fischer-Ratten mit einem Alter von 5 und 30 Monaten. Einige der alten Ratten wurden in ihren letzten zwei Lebensmonaten einer Kalorienrestriktion unterzogen. Bei den *ad libitum* gefütterten Tieren standen fünf junge (YAL) und sechs alte Individuen (OAL) zur Verfügung. Die Probenanzahl der Tiere mit Kalorienrestriktion (OCR) betrug vier Individuen, jedoch zeigten sich in der BN-PAGE für je zwei Proben dieser Gruppe deutlich unterschiedliche Proteinbandenprofile, sodass die Gruppe in OCR (1) und OCR (2) mit je zwei Individuen aufgespalten wurde. Von allen Gruppen wurden Probenpools angelegt und die Quantifizierung erfolgte auf der Grundlage von 12 Gelen.

Bei der OCR (1)-Gruppe wurde eine starke Disassemblierung von Superkomplexen beobachtet, die sich in deutlichen Mengenabnahmen der Superkomplexe und hohen Mengenzunahmen der individuellen Komplexe äußerte, was auf eine pathologische Störung der entsprechenden Individuen hindeutete. Bei den *ad libitum* gefütterten Tieren ließen sich altersbedingte Abnahmen der Proteinmengen bei Komplex  $III_2$  und IV, sowie den Superkomplexen  $III_2IV$  und  $I_1III_2$  detektieren. Eine Kalorienrestriktion im fortgeschrittenen Alter konnte bei der OCR (2)-Gruppe diese altersbedingten Mengenabnahmen bei Komplex IV und Superkomplex  $III_2IV$  teilweise kompensieren.

---

Die Kernaussagen der vorliegenden Dissertation können wie folgt zusammengefasst werden: In den drei untersuchten Geweben konnten Veränderungen der Proteinmengen und Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe, Superkomplexe und anderen mitochondrialen Proteinen infolge von Altern und Kalorienrestriktion nachgewiesen und quantifiziert werden, die wichtige Aussagen zu molekularen Prozessen des Alterns und der Kalorienrestriktion ermöglichen. Es zeigten sich teilweise Übereinstimmungen der Änderungen für Herzmuskel, Hirn und Leber, allerdings konnten ebenso gewebespezifische Unterschiede aufgedeckt werden. Für das Herzgewebe wurden teils deutliche Unterschiede zwischen den beiden analysierten Mitochondrienspezies detektiert. Das bedeutet, dass bei Experimenten mit Mitochondrien aus Herzmuskelgewebe aufgrund der biochemischen Unterschiede der subsarcolemmalen und interfibrillären Mitochondrien diese immer getrennt untersucht werden müssen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein Vergleich der Proteinmengen alleine nicht ausreicht, um die biochemischen Vorgänge in den Mitochondrien zu charakterisieren. Zusätzliche Analysen wie die hier durchgeführten Aktivitätstests sind essentiell für eine Charakterisierung des Alterns und der Kalorienrestriktion.

---

## 2 Einleitung

---

### 2.1 Die mitochondriale Theorie des Alterns

Die Frage nach den molekularen Ursachen für das Altern eines jeden Organismus kann bis heute nicht mit einer einfachen Erklärung beantwortet werden. Seit Jahrzehnten wird intensiv geforscht, welche physiologischen und zellulären Änderungen durch den Alternsprozess auftreten und wodurch diese hervorgerufen werden, um die Vorgänge zu verlangsamen oder gar umzukehren. Doch nach wie vor sind eher die Folgen des Alterns, wie Abnutzungserscheinungen von Gelenken, Abbau von Muskel- und Knochensubstanz und alterns-assoziierte Erkrankungen wie Krebs, Diabetes und Demenz, bekannt als deren Ursachen. Mittlerweile gibt es über 300 Theorien<sup>[1]</sup>, die versuchen, diesen komplexen Vorgang zu erklären. Dennoch fehlt eine allgemeingültige detaillierte Definition des Alternsprozesses. Im Allgemeinen handelt es sich um einen langsam fortschreitenden nicht-reversiblen Vorgang, der auf zellulärer Ebene eine Verminderung der Reaktionsfähigkeit auf zugefügten Stress bedingt und physiologisch einen Funktionsverlust von Geweben und Organen<sup>[2, 3]</sup> bis hin zum Tod nach sich zieht. Das Auftreten alterns-assoziiierter Krankheiten kann diesen Prozess teils stark beschleunigen.

Seit Mitte des 20. Jahrhunderts rückten die Mitochondrien immer mehr in den Fokus der aktuellen Alternsforschung. Dabei handelt es sich um kleine Zellorganellen, die als Ort der oxidativen Phosphorylierung und des Citratzyklus für die Bereitstellung des ultimativen Energieträgers ATP verantwortlich sind. Harman<sup>[4]</sup> postulierte 1956 bereits einen Zusammenhang zwischen dem Alternsprozess und der Akkumulation von Schädigungen an Makromolekülen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*) wie Superoxidradikal-Anionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale, der mittlerweile bestätigt werden konnte<sup>[5, 6]</sup>. Die Mitochondrien konnten nicht nur als Hauptquelle der ROS-Produktion identifiziert werden, sondern stellen auch ein Hauptziel der hochreaktiven Sauerstoffverbindungen<sup>[7, 8]</sup> dar. Während der oxidativen Phosphorylierung können an den Komplexen I und III<sub>2</sub> der Atmungskette ROS als Nebenprodukt entstehen<sup>[9]</sup>. Es werden etwa 0,2% des durch die Atmungskette verstoffwechselten Sauerstoffs zu ROS umgesetzt<sup>[10]</sup>, die in hohem Maße Schädigungen des Mitochondriums durch Mutationen der mitochondrialen DNA<sup>[11-14]</sup>, Peroxidationen der Membranlipide<sup>[15]</sup> und oxidative Modifikationen von Proteinen<sup>[16-18]</sup> verursachen können.

Der Vorgang der Ansammlung von ROS-induzierten Schäden in den Mitochondrien mit fortschreitendem Alter kann als eine Art Teufelskreis bezeichnet werden. Durch die

---

räumliche Nähe zum Hauptort der ROS-Produktion an der inneren Mitochondrienmembran und die im Vergleich zur nukleären DNA deutlich reduzierten Schutz- und Reparatursysteme ist die mitochondriale DNA (mtDNA) sehr anfällig für oxidative Schäden wie Mutationen, Deletionen und eine verminderte mRNA-Expression<sup>[13]</sup>. Da die mtDNA für insgesamt 13 Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe I, III, IV und der ATP-Synthase codiert<sup>[19]</sup>, können Schäden an den entsprechenden Genen zu fehlerhaften Proteinkomplexen führen, was wiederum eine gesteigerte ROS-Produktion zur Folge haben kann. Als eine Konsequenz dieser Schadensspirale kann eine Verminderung der Effizienz der oxidativen Phosphorylierung beobachtet werden<sup>[20]</sup>, die mit fortschreitendem Alter eine Veränderung des gesamten zellulären Energiemetabolismus verursacht<sup>[21, 22]</sup>.

Ebenfalls eine bedeutende Rolle für eine möglichst effizient ablaufende Respiration spielt die Lipidumgebung in der inneren Mitochondrienmembran. Obwohl die innere Mitochondrienmembran zu etwa 75% aus Proteinen und nur zu circa 25% aus Lipiden besteht, können altersbedingte Veränderungen in der Lipidzusammensetzung<sup>[23, 24]</sup> die oxidative Phosphorylierung (OxPhos) negativ beeinflussen. Im Zuge des Alterns tritt nicht nur eine Verminderung der Membranfluidität auf<sup>[15, 25]</sup>, die sowohl die Aktivität der Atmungskettenkomplexe<sup>[26]</sup> als auch den Aufbau des Protonengradienten<sup>[27]</sup> beeinträchtigt, sondern auch eine Abnahme des Cardiolipin-Anteils in der inneren Mitochondrienmembran<sup>[28]</sup>. Es wird vermutet, dass das Phospholipid Cardiolipin eine essentielle Rolle für die Aktivität und Stabilität der Atmungskettenkomplexe<sup>[28]</sup> und deren Assoziation zu höheren Strukturen<sup>[29]</sup>, den sogenannten Superkomplexen, spielt und diese in ihrer Konformation stabilisiert.

In den letzten Jahren konnte vermehrt gezeigt werden, dass einige oxidative Modifikationen wie Carbonylierungen an mitochondrialen Proteinen im höheren Alter seltener zu finden sind als in jüngerem Alter<sup>[30, 31]</sup>. Es wird vermutet, dass eine gesteigerte Turnover-Rate der Proteine ein Versuch der Kompensation des erhöhten Risikos von Schädigungen durch ROS darstellt.

Eine Schwierigkeit der Altersforschung liegt in der Diversität der Phänotypen des Alterns. Nicht jeder Organismus altert auf die gleiche Weise und nicht jedes Gewebe desselben Individuums altert mit der gleichen Geschwindigkeit. Nur das Erforschen des Alternsprozesses bei einer Vielzahl von Modellorganismen und in verschiedenen Gewebetypen kann die grundsätzlichen Mechanismen aufdecken. Das langfristige Ziel der Altersforschung sollte das Zusammenfügen der bereits bekannten Details und der noch zu erforschenden Vorgänge zu einem großen Ganzen sein, um den komplexen Vorgang des Alterns in seinem kompletten Ausmaß zu verstehen. Dieses Wissen kann genutzt werden, um den Prozess des Alterns mit mehr Gesundheit einhergehen zu lassen oder diesen sogar zu verlangsamen.



---

## 2.2 Kalorienrestriktion – ein Schluck aus dem Jungbrunnen?

Der Alternsprozess geht nicht nur mit körperlichen Einschränkungen wie Vergesslichkeit, dem Abbau von Muskel- und Knochenmasse oder der Bildung von Falten aufgrund von verminderter Elastizität der Haut einher, sondern auch häufig mit lebensbedrohlichen Erkrankungen, die infolge des Alterns entstehen und das Leben teils drastisch verkürzen können. Für Alzheimer, Parkinson, Krebs und Schizophrenie konnte bereits ein Zusammenhang mit mitochondrialen Dysfunktionen, die infolge des Alterns auftreten, gezeigt werden<sup>[32-34]</sup>.

Als erfolgversprechendste Intervention gegen das Altern und die damit assoziierten Erkrankungen wird derzeit die Kalorienrestriktion diskutiert. Dabei handelt es sich um eine Diät, die unter Vermeidung einer Mangelernährung die tägliche Kalorienzufuhr auf bis zu 50% des Normalwertes senkt. Bereits im Jahr 1935 konnte McCay<sup>[35]</sup> bei Ratten eine Lebensverlängerung von fast 50% durch eine dauerhaft um 33% verringerte Futtergabe im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten. Seitdem wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die die Auswirkungen einer Kalorienrestriktion in diversen Modellorganismen untersuchten. In einer Vielzahl der untersuchten Spezies wie Hefe<sup>[36, 37]</sup>, Nematoden<sup>[38]</sup>, Nagern<sup>[39-41]</sup> und Affen<sup>[42-45]</sup> konnte sowohl ein Rückgang der alternsassozierten Krankheiten als auch eine Verlängerung der mittleren und maximalen Lebensspanne nachgewiesen werden. Physiologisch manifestiert sich eine Kalorienrestriktion in einer verminderten Körpertemperatur<sup>[46]</sup>, Reduktion von Körpergewicht und Körperfettanteil<sup>[47]</sup>, Verringerung der Glucose- und Insulin-Konzentration im Blut<sup>[48]</sup> und eine Abschwächung des im Alter auftretenden Muskelabbaus<sup>[44]</sup>. In einer Vielzahl von Modellorganismen konnte eine verminderte Kalorienaufnahme neben dem Effekt einer Lebensverlängerung Krankheiten wie Diabetes, diverse Krebsarten und Herz-Kreislauf-Erkrankungen verzögern oder gar verhindern, jedoch sind diesbezüglich die Ergebnisse bei Rhesusaffen, die aufgrund ihrer nahen Verwandtschaft zum Menschen besonders in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt sind, noch widersprüchlich<sup>[45, 49]</sup>.

Auf zellulärer Ebene sind die Effekte der Kalorienrestriktion bisher noch nicht so hinreichend bekannt wie die Auswirkungen auf die Physiologie der untersuchten Organismen. Es konnte bisher gezeigt werden, dass alternsbedingte Änderungen der mRNA-Expression durch eine verminderte Futtergabe verringert oder gar umgekehrt werden können<sup>[50]</sup>, unabhängig von der Dauer der Kalorienrestriktion<sup>[51]</sup>. Ebenso treten eine Verzögerung der alternsbedingten Abnahme der Aktivität von Atmungskettenkomplexen<sup>[52]</sup> und eine Verminderung der ROS-Generierung auf<sup>[53-55]</sup>. Die bisher gefundenen Effekte auf zellulärer Ebene legen nahe, dass der Mechanismus auf einer Verminderung von oxidativem Stress in den Zellen beruht

---

und/oder durch eine Art Neuprogrammierung des Metabolismus<sup>[56]</sup> verursacht wird, die in einer veränderten Genexpression, insbesondere von Genen des Energiestoffwechsels<sup>[57]</sup> und inflammatorischen Proteinen resultiert<sup>[58]</sup>. Der genaue molekulare Wirkmechanismus einer niederkalorischen Ernährung ist bis heute größtenteils unbekannt. Gesichert ist jedoch die Erkenntnis, dass es sich um ein hochkomplexes Zusammenspiel von Enzymen und Transkriptionsfaktoren verschiedener Signalwege handelt. Eine wichtige Rolle scheint dabei das Sirtuin1, kurz Sirt1, eine NAD-abhängige Deacetylase<sup>[59]</sup>, zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass bei applizierter Kalorienrestriktion eine erhöhte Menge des Enzyms in der Zelle vorliegt<sup>[60, 61]</sup>. Sirt1 ist in der Lage den Tumorsuppressor p53 zu inhibieren<sup>[62]</sup>, was zu einer Verminderung der Apoptose-Rate führt<sup>[63]</sup>. Des Weiteren resultiert aus der Deacetylierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren durch Sirt1<sup>[59]</sup> eine gesteigerte Transkription von FOXO-Zielgenen, die unter anderem dem zellulären Energiemetabolismus und der Antwort auf oxidativen Stress angehören<sup>[64]</sup>.

Das Ziel der bereits Jahrzehnte dauernden Forschung an diversen Säugetieren ist sicherlich die Übertragung der gesundheitsfördernden und lebensverlängernden Eigenschaften der Kalorienrestriktion auf den Menschen. Obwohl mittlerweile in vielen Säugetier-Spezies diese Effekte nachgewiesen werden konnten, gibt es unter den Experten uneinheitliche Meinungen bezüglich der Übertragbarkeit auf den Menschen. Es wird angezweifelt, dass der in evolutionär entfernten Organismen häufig beobachtete Effekt einer Verlängerung der maximalen Lebensspanne um bis zu 50% durch eine Kalorienrestriktion auch in Menschen auftreten würde. Als Argument für diese Annahme werden unter anderem die Bewohner der japanischen Insel Okinawa genannt. Durch Lebensmittelverknappung in der Vergangenheit wurden die Einwohner unfreiwillig einer Kalorienrestriktion unterzogen. Dadurch lag lange Zeit die durchschnittliche Lebensspanne in der Region deutlich über dem Durchschnitt des restlichen Japans und anderer Industrieländer. Trotz der extrem hohen Rate an Hundertjährigen konnte keiner die von Experten angesehene maximale Lebensspanne des Menschen von etwa 120 Jahren überschreiten. Es konnte durch Studien belegt werden, dass die Kalorienaufnahme der Okinawa-Bewohner nur bei 83% der durchschnittlichen Energieaufnahme der restlichen japanischen Bevölkerung lag<sup>[65]</sup>. Trotz einer fehlenden Verlängerung der maximalen Lebensspanne, wurde durch die Kalorienrestriktion die Inzidenz von altersassoziierten Krankheiten wie Schlaganfall, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs und Diabetes um 30% bis 40% im Vergleich zur durchschnittlichen japanischen Bevölkerung gesenkt<sup>[65]</sup> und ein überdurchschnittlich guter Gesundheitszustand erzielt<sup>[66]</sup>.

---

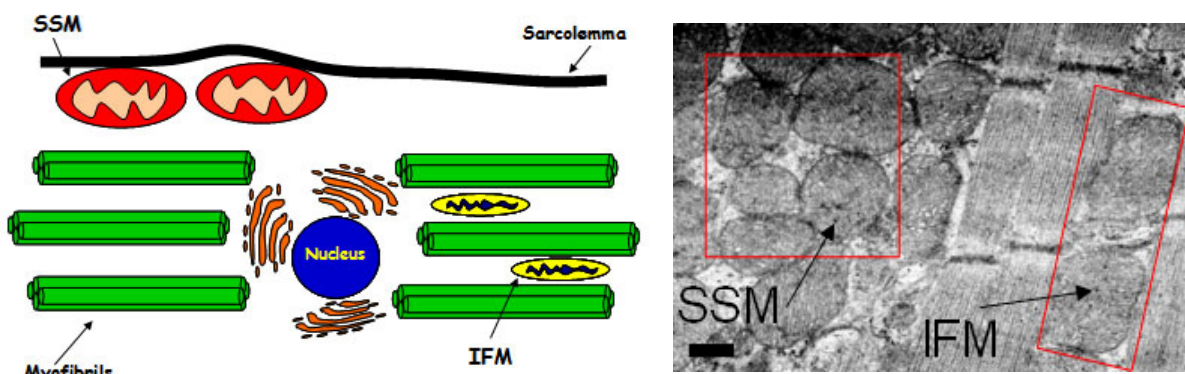
Forster *et al.*<sup>[67]</sup> konnten 2003 zeigen, dass eine Kalorienrestriktion bei Mäusen nicht generell eine Verlängerung der Lebensspanne hervorruft. Der Maus-Stamm DBA/2 zeigte zwar einige der in Nagern beobachteten physiologischen Effekte einer Kalorienrestriktion, eine Lebensverlängerung blieb jedoch aus. Mattison *et al.*<sup>[49]</sup> vom National Institute of Aging (NIA) konnten 2012 in ihrer vor ca. 25 Jahren gestarteten Studie keine lebensverlängernden Effekte einer Kalorienrestriktion auf Rhesusaffen nachweisen. Damit widersprechen sie Colman *et al.*<sup>[45]</sup> vom Wisconsin Primate Research Center (WNPRC), die in einer ähnlichen Studie ebenfalls an Rhesusaffen eine Lebensverlängerung aufgrund einer Kalorienrestriktion beobachten konnten. In beiden Studien wurde die Kalorienaufnahme um 30% reduziert, jedoch gab es Unterschiede bezüglich der Futterzusammensetzung und bei der Futtermenge der Kontrollgruppe. Während die Affen vom WNPRC tatsächlich unbeschränkten Zugang zu Futter hatten und damit zu Übergewicht neigten, wurde den Kontrolltieren am NIA eine leicht verminderte Futtermenge gegeben als die, die sie sich selbst genommen hätten, um ein Normalgewicht zu gewährleisten. Die Ergebnisse der Studien mit DBA/2-Mäusen und Rhesusaffen könnte darauf hindeuten, dass eine Kalorienrestriktion nur dann zu einer Lebensverlängerung führt, wenn die Tiere der Kontrollgruppe zu Übergewicht neigen.

In den Industrieländern wird die Bevölkerung aufgrund eines Überangebots an Nahrung immer übergewichtiger, was zu einem schlechteren Allgemeinzustand des Körpers und zu einer verkürzten Lebensspanne führt. Möglicherweise könnte eine Kalorienrestriktion die negativen Effekte von mittlerem bis starkem Übergewicht abschwächen oder gar umkehren und so wieder zu mehr Gesundheit und zu einem verlängerten Leben beitragen. Allerdings ist eine Kalorienrestriktion im täglichen Leben nicht sehr praktikabel und schwer umsetzbar. Aufgrund dessen sind sogenannte Mimetika von starkem Interesse, pharmakologisch wirksame Substanzen, die den Wirkmechanismus einer Kalorienrestriktion auslösen ohne dem Organismus tatsächlich weniger Kalorien zuzuführen. Ein solches Therapeutikum könnte somit zu einer gesünderen und normalgewichtigen Gesellschaft beitragen. Der bekannteste Vertreter dieser Mimetika ist das Resveratrol, ein Polyphenol, das vor allem in der Haut von roten Weintrauben vorkommt. Über die molekulare Wirkung von Resveratrol auf den Organismus und über die Frage, ob dieses tatsächlich ähnliche Effekte hervorruft wie eine Kalorienrestriktion, herrscht jedoch zurzeit Uneinigkeit unter den Experten<sup>[68-73]</sup>.

## 2.3 Das Herz – ein besonderes Organ

Das Herz ist ein starker sich ständig kontrahierender Muskel und das lebenswichtigste Organ eines jeden Organismus. Es versorgt den Körper durch den Blutkreislauf mit Nährstoffen und transportiert den für die Energieversorgung benötigten Sauerstoff in die Zellen. Beim Menschen wiegt das Herz durchschnittlich etwa 300 Gramm und macht somit nur etwa 0,4 bis 0,5% des Körpergewichtes aus. Jedoch verbraucht das Herz alleine etwa 10% des aufgenommenen Sauerstoffs, dessen Verbrauch für den ganzen Körper in Ruhe bei 150-300 mL pro Minute liegt<sup>[74]</sup>. Das koronare Gefäßsystem, das den Herzmuskel umgibt, stellt die Deckung des eigenen hohen Sauerstoffbedarfs sicher. Da es sich bei dem Myokard um ein postmitotisches Gewebe handelt, werden nur in äußerst geringem Maße neue Herzmuskelzellen, auch Kardiomyozyten genannt, gebildet. Bergmann *et al.*<sup>[75]</sup> konnten 2009 zeigen, dass die Regenerationsrate bei durchschnittlich etwa 1% pro Jahr im Alter von 25 Jahren liegt und bis zu einem Alter von 75 Jahren auf nur noch 0,45% absinkt. Im Gegensatz zu Skelettmuskeln bilden die Kardiomyozyten kein Synzytium aus, jedoch sind die Zellen sehr eng über die sogenannten Glanzstreifen miteinander verbunden, die dafür sorgen, dass sich die Herzmuskelzellen funktionell wie ein Synzytium verhalten.

Eine Besonderheit von Skelett- und Herzmuskelzellen ist die Präsenz zweier verschiedener Mitochondrienspezies<sup>[76]</sup>, die zusammengenommen bei Säugern bis zu 50% des Volumens der Kardiomyozyten ausmachen können<sup>[77, 78]</sup>. Die beiden Spezies werden durch ihre Lage in den Muskelzellen definiert: die subsarcolemmalen Mitochondrien befinden sich direkt unter der Plasmamembran und die interfibrillären Mitochondrien sind zwischen den Myofibrillen lokalisiert (Abbildung 1.1). Bei der Isolierung von Mitochondrien aus (Herz-)Muskelgewebe kann für beide Spezies in etwa die gleiche Ausbeute erzielt werden<sup>[79, 80]</sup>.



**Abb. 1.1:** Schematische (links) und elektronenmikroskopische (rechts) Darstellung<sup>[81]</sup> der Lage der beiden detektierbaren Mitochondrienspezies in Skelett- und Herzmuskelzellen, subsarcolemmale (SSM) und interfibrilläre Mitochondrien (IFM).

---

Ferreira *et al.*<sup>[82]</sup> konnten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die subsarcolemmalen Mitochondrien größer als die interfibrillären Mitochondrien sind. Es wird davon ausgegangen, dass die interfibrillären Mitochondrien die Energie für die Muskelkontraktion bereitstellen, während das durch die subsarcolemmale Spezies generierte ATP für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase genutzt wird<sup>[83, 84]</sup>. Das in den Mitochondrien der Kardiomyozyten erzeugte ATP stammt zu über 90% aus der oxidativen Phosphorylierung<sup>[85, 86]</sup>, während der verbleibende Anteil durch die Glykolyse gedeckt wird<sup>[87]</sup>. Die messbare ATP-Konzentration bleibt in den Herzmuskelzellen auch bei moderater Anstrengung konstant. Dafür verantwortlich ist das Kreatin, das in der phosphorylierten Form als Träger der energiereichen Phosphorylgruppe eingesetzt wird und diese in die Bereiche des Gewebes transportiert, in denen Energiebedarf besteht. Dort wird das unter Verbrauch von ATP durch die Muskelkontraktion entstandene ADP rephosphoryliert<sup>[88]</sup>. Durch diesen Zwischenspeicher wird der gesamte ATP-Pool der Kardiomyozyten alle 4-5 Sekunden erneuert<sup>[89]</sup>.

Die beiden Mitochondrienspezies unterscheiden sich nicht nur in der Lokalisation und der Größe, sondern auch in ihrem biochemischen Verhalten. So konnten für die interfibrilläre Spezies höhere Respirationsraten und Aktivitäten von Enzymen unter anderem des Citratzyklus gemessen werden<sup>[76]</sup>. Die Menge an interfibrillären Mitochondrien nimmt mit dem Alter ab und es lässt sich im Gegensatz zu den subsarcolemmalen Mitochondrien altersbedingt eine Abnahme der oxidativen Kapazität beobachten<sup>[90]</sup>.

## 2.4 Motivation

Das Ziel dieser Arbeit ist die Aufdeckung von molekularen Prozessen auf Proteomebene, die das Altern und die lebensverlängernde Wirkung der Kalorienrestriktion bewirken. Um allgemeingültige Effekte aufzeigen zu können, werden Mitochondrien aus den drei physiologisch verschiedenen Geweben Herz, Hirn und Leber untersucht.

Durch die Kombination von blau-nativer und SDS-Gelelektrophorese sollen die mitochondrialen Proteine aufgetrennt werden. Anschließend wird auf der Grundlage einer Fluoreszenzfärbung die Quantifizierung von mitochondrialen Proteinen mit Schwerpunkt auf Komplexe und Superkomplexe der Atmungskette durchgeführt. *In-Gel*-Aktivitätsmessungen der Komplexe I und IV sollen weitere Einblicke in das komplexe Zusammenspiel von Energiemetabolismus, Altern und Kalorienrestriktion gewähren.

---

## 3 Materialien

---

### 3.1 Chemikalien

$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma M-6250
$\beta$ -NADH, reduziert, Dinatriumsalz-Hydrat	Sigma N-6005
1,4-Dithiothreitol p.a.	Roth 6908.2
4-Iodophenylboronsäure	Aldrich 471933
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) Dinatriumsalz	Roth A155.2
6-Aminohexansäure	Fluka 07260
Acrylamid Rotiphorese <sup>®</sup> A	Roth 3037.1
Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	Roth A515.1
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka 09915
Bisacrylamid Rotiphorese <sup>®</sup> B	Roth 3039.1
Bovine Serum Albumin (BSA) Fraktion V	Roth 8076.2
Bromphenolblau	Fluka 18030
Cytochrom c aus Rinderherz	Fluka 30398
D-(+)-Saccharose	Roth 4621.2
D-(-)-Mannit	Roth 4175
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma D5637
Digitonin	Acros 407565000 (Charge A0280740)
Digitonin	Calbiochem 300410 (Charge D00033214)
Dimethylformamid (DMF)	Merck 2937
Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Molekularbiologie	Roth A994.2
Dinatriumhydrogenphosphat p.a.	Fluka 71642
Essigsäure p.a.	Roth 3738.5
Ethanol, technisch	Chemikalienausgabe FB Chemie
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Tetranatriumsalz Dihydrat	Sigma E-6511
Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-tetraacetat (EGTA)	Sigma 8145
Formaldehyd 37% p.a.	Roth 4979.1
Glycerin	Roth 3783.2
Glycin p.a.	Roth 3908.2
HEPES	AppliChem A1069
Imidazol	Fluka 56750
Isopropanol, technisch	Chemikalienausgabe FB Chemie

Kaliumacetat	Fluka 60034
Kaliumchlorid	Roth 6781.3
Kaliumhydroxid	Fluka 60370
Luminol	Fluka 09253
Magnesiumchlorid Hexahydrat p.a.	Roth A537.1
Methanol p.a.	Roth 4627.6
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe FB Chemie
Molekularmassenstandard HMW	Amersham 17-0445-01
Molekularmassenstandard LMW	Amersham 17-0446-01
MOPS	Roth 6979.4
Natriumcarbonat wasserfrei	Roth A135.2
Natriumchlorid p.a.	Roth 3957.1
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat p.a.	Roth T879.1
Natriumhydroxid p.a.	Roth 6771.1
Natriumphosphat Dodecahydrat	Fluka 71642
Natriumsuccinat Hexahydrat	Sigma S2378
Natriumthiosulfat Pentahydrat p.a.	Merck 106516
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Roth 4421.4
OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit	Chemicon S7150
Pefabloc SC <sup>®</sup>	Biomol
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka 78830
p-Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT) p.a.	Roth 4421.4
Ponceau S	Sigma P3504
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma P8340
Roti <sup>®</sup> -Blot 2A, 10x Konzentrat	Roth P037.1
Roti <sup>®</sup> -Blot 2K, 10x Konzentrat	Roth P038.1
Roti <sup>®</sup> -Blue 5x Konzentrat	Roth A152.1
Roti <sup>®</sup> -Free	Roth 0083.1
Roti <sup>®</sup> -Nanoquant	Roth
Salzsäure rauchend 37% p.a.	Roth 4625.1
Salzsäure 30% Suprapur <sup>®</sup>	Merck 1.00318
SCAVEGR <sup>™</sup>	BrainBitsLLC / USA
SDS Pellets	Roth CN30.1
SDS ultra pure	Roth 2326.1
Serva Blue G (Coomassie Brilliant Blue G-250)	Serva 35050
Silbernitrat p.a.	Roth 7908.1



---

SYPRO <sup>®</sup> Ruby Protein Gel Stain, 1x	BioRad 170-3138
TEMED	Sigma T9281
Tricin	Roth 6977.3
TRIS	Roth 4855.2
Tween <sup>®</sup> 20	Roth 9127.1
Wasserstoffperoxid 30%	Merck 107209

### 3.2 Geräte

Bio-Imaging-System ViewPix 900	Biostep / Epson
Combitips plus 25, 10, 5 und 2,5 mL	Eppendorf
Digitalkamera EOS 300D	Canon
Dual Gel Caster SE 245	Hoefer
Elektronikrührer Multipoint HP6	Variomag
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences
Electrophoresis Power Supply EPS 600	Pharmacia
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Pharmacia Biotech
Electrophoresis Power Supply EPS 1001	Amersham Pharmacia Biotech
Gelelektrophorese-Apparatur SE 250 Mighty Small II	Hoefer
Gelelektrophorese-Apparatur SE 260 Mighty Small II	Hoefer
Gelelektrophorese-Apparatur SE 400 Ruby	Hoefer / Pharmacia Biotech
Gelelektrophorese-Apparatur SE 600 Ruby	Amersham Biosciences
Gelelektrophorese-Apparatur SE 600 Chroma	Hoefer
Gelfärbeschalen	Roth
Gelgießapparatur Dual Gel Caster SE 245	Hoefer / Amersham Biosciences
Gradientenmischer 2 x 30 mL	Werkstatt FB Chemie
GS-800 Calibrated Densitometer	BioRad
Hebebühne DIN 12897	Bochem
Homogenisator, Glas-Teflon, 2 mL, <i>tight-fit</i>	Braun
Lichttisch G-2004	GEPE
Luminescent Image Analyzer LAS-3000	Fujifilm
Magnetrührer CB161	Bibby Scientific
Magnetrührer Combimag RCT	IKA
Magnetrührer Combimag REO	IKA
Magnetrührer MR 3001	Heidolph



Magnetrührer RCT basic	IKA
Multipette® plus	Eppendorf
Peristaltikpumpe Minipuls® 3	Gilson
pH-Elektrode BlueLine 14 pH	Schott
pH-Meter CG 842	Schott
Pipetten 2, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µL	Abimed-Gilson
Rührwerk Eurostar digital	IKA
Schüttler 3016	GFL
Schüttler HS 260 basic	IKA
Tischzentrifuge MicroV	Fisher Scientific
Trans-Blot® SD Semi-dry Electrophoretic Transfer Cell	BioRad
Ultraschallbad Sonorex TK 52 H	Bandelin
UV-VIS Spektralphotometer UV-2401 PC	Shimadzu
Vortex VF2	Janke & Kunkel / IKA
Vortex REAX 1DR	Heidolph
Waage R 200 D	Sartorius
Waage U 4100 S	Sartorius
Wasseraufbereitungssystem Simplicity	Millipore
Wasserbad 1004	GFL
Water Still Distinction D4000	Stuart
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge primoR	Heraeus
Zentrifugenrotor # 7593	Heraeus
Zentrifugenrotor F-34-6-38	Eppendorf
Zentrifugenrotor F-45-30-11	Eppendorf

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

Einweg-Pasteurpipetten, dünne Spitze	Roth EA58.1
Einweg-Pasteurpipetten, graduert	Roth EA62.1
Einmalküvetten PLASTIBRAND® PMMA 1,5 mL halbmikro	Brand 7591 15
Faltenfilter 595 ½ Ø 240 mm	Schleicher & Schuell 311.651
Kapillar-Pipettenspitzen, MicroTips XL, 10 µL	Biozym 729025
Kapillar-Pipettenspitzen, 200 µL	Biozym 719015
Membranfilter RC 55, Ø 47 mm, Porengröße 0,45 µm	Schleicher & Schuell 10 410 214

Membranfilter RC 58, Ø 47 mm, Porengröße 0,2 µm	Whatman 10 410 314
OMNITIP™ Fastrack 10 µL reload	ULPlast 81710
Pipettenspitzen 10 µL	Biozym 720015
Pipettenspitzen 200 µL	greiner bio-one 739 290
Pipettenspitzen 1000 µL	greiner bio-one 740 290
Pipettenspitzen Standard MAKRO 5000 µL	Roth 5846.1
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark 05511
Reaktionsgefäße 0,2 mL	Axygen PCR-02D-C
Reaktionsgefäße 0,2 mL	Thermo Scientific AB-0620
Reaktionsgefäße 0,65 mL	Roth 7060.1
Reaktionsgefäße 1,5 mL	
Reaktionsgefäße 2 mL	Eppendorf 0030 120.094
Röhrchen, PP, steril, 15 mL	greiner bio-one 188 271
Röhrchen, PP, steril, 50 mL	greiner bio-one 210 270
Rotilabo®-Blottingpapier 1,5 mm	Roth CL75.1
Rotiprotect®-Latexhandschuhe, puderfrei, Größe M	Roth L950.1
Sequiblot™ PVDF-Membran	BioRad 162-0182
Simpak® 2 für Wasseraufbereitungssystem Simplicity	Millipore SIMPAK0D2

### 3.4 Software

Corel DRAW 11	Corel
Corel PHOTO-PAINT 11	Corel
Delta2D 3.6	Decodon
Endnote X2	The Thomson Corporation
Excel 2003	Microsoft
Image Reader LAS-3000 für Windows 2.1	Fujifilm
Powerpoint 2003	Microsoft
QuantityOne 4.4	BioRad
UVProbe 1.11	Shimadzu
Word 2003	Microsoft

---

## 3.5 Proben

### 3.5.1 Herz- und Hirnproben aus *Rattus norvegicus*

Die Herz- und Hirngewebeproben stammen von männlichen F344 Fischer-Ratten der Spezies *Rattus norvegicus*. Die Proben stammen aus Japan und wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Sataro Goto (aktuelle Adresse: Juntendo University, Inbamura, Inbagun, Chiba 270-1695, Japan) zur Verfügung gestellt. Bei den Proben aus Rattenhirn handelt es sich um Cerebrumgewebe, das auch als Großhirn bezeichnet wird. Es besteht aus dem Cortex, den Basalganglien und dem limbischen System. Nach der Präparation in Japan wurden die Gewebeproben in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Die Überführung der Proben nach Deutschland erfolgte auf Trockeneis. Bis zur Isolierung der Mitochondrien wurden sie weiterhin bei -80 °C gelagert.

Beide Gewebearten, also Herz und Cerebrum, stammen jeweils aus den gleichen Individuen. Das bedeutet, dass es sich bei Tier 1 bei Herzgewebe und Tier 1 bei Hirngewebe um dasselbe Tier handelt. Die Ratten, denen die Proben entnommen wurden, waren zum Zeitpunkt der Tötung 6,5 oder 27 Monate alt und wurden zuvor entweder *ad libitum* gefüttert oder einer Kalorienrestriktion unterzogen, mit Fütterungen jeweils montags, mittwochs und freitags. Somit können die Proben, wie in Tabelle 3.1 dargestellt, in vier verschiedene Gruppen eingeteilt werden: junge Individuen mit und ohne Kalorienrestriktion (YCR = young, calorie restricted und YAL = young, *ad libitum*) und alte Individuen mit und ohne Kalorienrestriktion (OCR = old, calorie restricted und OAL = old, *ad libitum*). Die Tiere der beiden Gruppen mit Kalorienrestriktion wurden bis zu einem Alter von 6 Wochen ebenso wie die beiden Kontrollgruppen *ad libitum* gefüttert. Erst ab diesem Zeitpunkt wurde die Kalorienrestriktion appliziert, damit sich die Tiere in den ersten Lebenswochen normal entwickeln können und nicht während der stärksten Wachstumsphase durch Nahrungsmangel in ihrer Entwicklung hin den anderen Tieren zurück bleiben. Der Grad der Kalorienrestriktion wird durch das Verhältnis der Mittelwerte des Körpergewichts zum Tötungszeitpunkt von Ratten mit Kalorienrestriktion zu normal gefütterten Ratten ermittelt und beträgt bei den hier vorliegenden Proben 40% für die jungen Tiere und 37% für die alten Individuen.

Die Isolierung der Mitochondrien aus Hirnproben wurde von Dr. Diksha Dani der Arbeitsgruppe Dencher im Sommer 2009 durchgeführt. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte unter meiner Anleitung durch Michaela Söhn im Rahmen ihrer Diplomarbeit<sup>[91]</sup>.

Die Herzproben wurden ausschließlich von mir bearbeitet, wobei die Isolierung der Mitochondrien im August und September 2009 erfolgte.

**Tab. 3.1: Bezeichnung, Alter und Gewicht der erhaltenen Herz- und Hirn-Proben. Bei einigen Hirn-Proben wurde nur aus etwa der Hälfte des Gewebes die Mitochondrien isoliert. Diese Proben sind mit \* gekennzeichnet.**

Gewebe	Ratte	Alter	Gewicht [g] Herz / Hirn	Sterbedatum
Herz / Hirn	6.5M-1 (YAL 1)	6,5 Monate	0,88 / 0,81	16.12.08
Herz / Hirn	6.5M-2 (YAL 2)	6,5 Monate	1,00 / 1,02	16.12.08
Herz / Hirn	6.5M-3 (YAL 3)	6,5 Monate	0,99 / 1,04	16.12.08
Herz / Hirn	6.5M-4 (YAL 4)	6,5 Monate	1,00 / 1,07	16.12.08
Herz / Hirn	6.5M-5 (YAL 5)	6,5 Monate	0,97 / 0,99	16.12.08
Herz / Hirn	6.5M-1 CR (YCR 1)	6,5 Monate	0,59 / 0,61	16.12.08
Herz / Hirn	6.5M-2 CR (YCR 2)	6,5 Monate	0,51 / 1,03	16.12.08
Herz / Hirn	6.5M-3 CR (YCR 3)	6,5 Monate	0,65 / 0,94	16.12.08
Herz / Hirn	6.5M-4 CR (YCR 4)	6,5 Monate	0,51 / 0,98	16.12.08
Herz / Hirn	6.5M-5 CR (YCR 5)	6,5 Monate	0,57 / 0,92	16.12.08
Herz / Hirn	27M-1 (OAL 1)	27 Monate	1,03 / 0,44*	27.02.09
Herz / Hirn	27M-2 (OAL 2)	27 Monate	0,96 / 0,36*	27.02.09
Herz / Hirn	27M-3 (OAL 3)	27 Monate	0,94 / 0,50*	27.02.09
Herz / Hirn	27M-4 (OAL 4)	27 Monate	1,01 / 0,54*	27.02.09
Herz / Hirn	27M-5 (OAL 5)	27 Monate	0,98 / 0,47*	27.02.09
Herz / Hirn	27M-6 (OAL 6)	27 Monate	0,95 / 0,39*	27.02.09
Herz / Hirn	27M-1 CR (OCR 1)	27 Monate	0,64 / 0,50*	27.02.09
Herz / Hirn	27M-2 CR (OCR 2)	27 Monate	0,64 / 0,51*	27.02.09
Herz / Hirn	27M-3 CR (OCR 3)	27 Monate	0,70 / 0,39*	27.02.09
Herz / Hirn	27M-4 CR (OCR 4)	27 Monate	0,82 / 0,43*	27.02.09
Herz / Hirn	27M-5 CR (OCR 5)	27 Monate	0,78 / 0,47*	27.02.09
Herz / Hirn	27M-6 CR (OCR 6)	27 Monate	0,77 / 0,30*	27.02.09

### 3.5.2 Leberproben aus *Rattus norvegicus*

Die Lebergewebeproben stammen von männlichen F-344 Fischer-Ratten der Spezies *Rattus norvegicus*. Die Proben wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Sataro Goto zur Verfügung gestellt, es handelt sich dabei allerdings nicht um die gleiche Zucht, aus der die Herz- und Hirnproben gewonnen wurden. Es handelt sich bei den Proben nicht um das komplette Organ, sondern um einen Teil davon, der etwa der Hälfte des Gesamtgewichts der Leber entspricht. Die Gewebeproben wurden nach der Präparation in Japan in flüssigem Stickstoff eingefroren und in Trockeneis nach Deutschland überführt. Bis zur Isolierung der Mitochondrien wurden die Gewebeproben bei -80 °C gelagert.

Die in Tabelle 3.2 gezeigten Proben wurden bereits von mir in meiner Diplomarbeit<sup>[92]</sup> einzeln analysiert. Da diese Analyse jedoch aufgrund der zu geringen Anzahl an Individuen zu wenig Aussagekraft besaß, wurden einige weitere Proben von Individuen der gleichen Zucht

angefordert, um diese zusammen mit den ersten Proben als Pool erneut zu analysieren. Die nachträglich angeforderten Proben sind in Tabelle 3.3 gezeigt.

**Tab. 3.2: Bezeichnung, Alter und Gewicht der erhaltenen Leber-Proben.**

<b>Gewebe</b>	<b>Ratte</b>	<b>Alter</b>	<b>Gewicht [g]</b>	<b>Sterbedatum</b>
Leber	YAL 5m F522-1	5 Monate	1,02	21.01.04
Leber	YAL 5m F523-2	5 Monate	1,09	21.01.04
Leber	YAL 5m F523-3	5 Monate	0,98	21.01.04
Leber	OAL 30m F514-1	30 Monate	1,06	20.01.04
Leber	OAL 30m F517-2	30 Monate	1,13	20.01.04
Leber	OAL 30m F517-3	30 Monate	1,05	20.01.04
Leber	OCR 30m F509-2	30 Monate	1,08	20.01.04
Leber	OCR 30m F516-1	30 Monate	1,04	20.01.04
Leber	OCR 30m F516-2	30 Monate	1,03	20.01.04

Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Tötung 5 bzw. 30 Monate alt. Die mit OCR bezeichneten 30 Monate alten Tiere wurden in den beiden letzten Lebensmonaten einer Kalorienrestriktion unterzogen, bei der sie ausschließlich montags, mittwochs und freitags die übliche Futtermenge erhielten, während die anderen sechs Tiere ihre tägliche Menge an Futter nach Belieben aufnehmen konnten. Die Tötung der OCR-Tiere erfolgte einen Tag nach der letzten Futteraufnahme.

Die Präparation der Gewebeproben, die bereits in meiner Diplomarbeit<sup>[92]</sup> untersucht wurden, erfolgte in dem Zeitraum zwischen Juli und November 2007. Bei den nachträglich angeforderten Proben wurde die Isolierung der Mitochondrien jeweils im September 2008 durchgeführt.

**Tab. 3.3: Bezeichnung, Alter und Gewicht der nachträglich angeforderten Leberproben.**

<b>Gewebe</b>	<b>Ratte</b>	<b>Alter</b>	<b>Gewicht [g]</b>	<b>Sterbedatum</b>
Leber	YAL 5m F522-2	5 Monate	0,50	21.01.04
Leber	YAL 5m F522-3	5 Monate	0,59	21.01.04
Leber	YAL 5m F523-1	5 Monate	0,35	21.01.04
Leber	YAL 5m F523-3	5 Monate	0,72	21.01.04
Leber	OAL 30m F514-2	30 Monate	1,11	20.01.04
Leber	OAL 30m F514b-1	30 Monate	1,13	20.01.04
Leber	OAL 30m F515-1	30 Monate	1,15	20.01.04
Leber	OAL 30m F515-2	30 Monate	0,62	20.01.04
Leber	OCR 30m F509-1	30 Monate	0,35	20.01.04

---

### 3.5.3 Rinderherz

Im Rahmen eines Praktikums wurde im Sommer 2008 von Dr. Monika Frenzel ein frisches Rinderherz von einem Schlachthof in der Region abgeholt und am selben Tag eine Isolierung der Mitochondrien aus einem Großteil des frischen Gewebes durch Studenten unter ihrer Anleitung durchgeführt. Der Rest des Gewebes wurde in grobe Stücke zerteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Alter, Geschlecht und Rasse des Tieres sind unbekannt.

Die Rinderherzmitochondrien, die in dieser Arbeit als Standard bei der Gelelektrophorese verwendet werden, stammen aus der Mitochondrienisolierung des frischen Gewebes.

Für die durchgeführten OxyBlot-Studien, bei der Rinderherzmitochondrien bezüglich des Effekts des Anti-Oxidantien-Cocktails SCAVEGR™ verglichen werden, wurden zwei der eingefrorenen groben Stücken für die Isolierung der Mitochondrien verwendet.

---

## 4 Methoden

---

### 4.1 Isolierung von Mitochondrien aus Gewebe

#### 4.1.1 Isolierung der Mitochondrien aus Rinderherz

Die Isolierung der Mitochondrien aus Rinderherz erfolgt nach dem von Reifschneider<sup>[93]</sup> beschriebenen Schema mit kleineren im Folgenden aufgeführten Abweichungen.

Alle Schritte zur Isolierung der Mitochondrien werden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Gerätschaften und Gefäße, die hierfür verwendet werden, müssen vorgekühlt und gegebenenfalls mit MilliQ gespült sein.

Da in dieser Arbeit Gewebestücke mit einem Feuchtgewicht von je ca. 2 g verwendet wurden, sind die Gerätschaften, die für die Isolierung zum Einsatz kommen, deutlich kleiner als bei dem von Reifschneider<sup>[93]</sup> beschriebenen Ansatz für 300 g Gewebe. Statt mit einem Haushaltsmixer wird das Gewebe mit Hilfe eines Skalpells vor der Homogenisierung grob zerkleinert. Da Saccharose-Lösung A ausschließlich für das Mixen mit einem Pürierstab verwendet wird, der im hier nicht zum Einsatz kommt, wird diese für die hier durchgeführte Isolierung nicht benötigt. Hier wird nach dem Zerkleinern des Gewebes mit Saccharose-Lösung B wie bei Reifschneider beschrieben homogenisiert. Hierfür wird ein 2 mL *tight-fit* Glas-Teflon-Homogenisator verwendet und es werden 5 Hübe bei 1400 Umdrehungen pro Minute (rpm) ausgeführt. Da das Gewebe mit dem 10-fachen an Puffer versetzt werden muss, wird in Portionen homogenisiert und anschließend die Homogenisate in einem 50 mL Blue-Cap-Röhrchen wieder vereint. Im Verlauf der Mitochondrienisolierung wird nur 1x der pH-Wert der Gewebesuspension mit Tris-Lösung eingestellt. Dies geschieht vor der ersten Zentrifugation. Alle weiteren Schritte können bei Reifschneider<sup>[93]</sup> nachgelesen werden.

**Tab. 4.1:** Zusammensetzung der zur Isolierung von Rinderherzmitochondrien benutzten Puffer und Lösungen.

<b>Saccharose-Lösung B</b>		<b>Tris-Lösung</b>	
250 mM	Saccharose	2 M	Tris
2 mM	Tris / HCl pH 7,8	in MilliQ, pH 10,8 stellt sich ein	
1 mM	Natriumsuccinat		
0,2 mM	EDTA		
0,5 mM	Pefabloc SC <sup>®</sup>		
in MilliQ, steril			
2% (v/v) SCAVEGR <sup>™</sup> (frisch hinzugeben)			

---

#### 4.1.2 Isolierung der Mitochondrien aus Rattenleber

Alle nachfolgenden Schritte zur Isolierung der Mitochondrien aus Rattenleber werden entweder auf Eis oder bei 4°C durchgeführt, zum Einsatz kommende Gerätschaften und Behältnisse werden vorgekühlt und mit MilliQ gespült. Zu verwendende Puffer werden vor Gebrauch mit SCAVEGR™ (Anti-Oxidantien-Mischung) und PIC (Protease-Inhibitor-Cocktail) oder mit Pefabloc SC® (Cystein- und Serin-Protease-Inhibitor) versetzt.

Das bei -80°C gelagerte Gewebe wird auf Eis aufgetaut, gewogen, mit einem Skalpell in kleine Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 1 mm geschnitten und in mehreren Portionen homogenisiert. Hierfür werden die einzelnen Gewebeportionen mit einem Gewicht zwischen 200 und 300 mg in einen 2 mL *tight-fit* Glas-Teflon-Homogenisator überführt und mit dem 10-fachen Volumen an Homogenisierungspuffer versetzt. Die anschließende Homogenisierung erfolgt durch 5 Hübe bei 800 rpm.

Die Homogenisat-Portionen werden in ein 15 mL Blue-Cap-Röhrchen gesammelt. Nach dem letzten Homogenisierungsschritt werden sowohl der Homogenisator selber als auch das Pistill mit 1 mL Homogenisierungspuffer gespült. Dieser wird mit dem Homogenisat vereint, um eventuell an und in der Apparatur verbliebene Reste nicht zu verlieren. Das Homogenisat wird nun bei 80 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert (Rotor F34-6-38). Da hierbei Zelltrümmer vom Aufschluss des Gewebes sedimentiert werden, wird der Überstand, der die Mitochondrien enthält, in ein neues Röhrchen überführt. Um den Verlust an Mitochondrien so gering wie möglich zu halten, wird das Zelltrümmer-Pellet 2 Mal mit Puffer gewaschen. Hierfür wird das Pellet mit je 1 mL Homogenisierungspuffer resuspendiert und erneut bei gleicher *g*-Zahl und gleicher Zeit zentrifugiert. Die so erhaltenen Überstände werden mit dem Überstand der ersten Zentrifugation vereinigt.

Um noch im Überstand verbliebene Zelltrümmer aus der Suspension zu isolieren, wird eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine einzige Stufe mit 350 mM Saccharose, während der Homogenisierungspuffer 250 mM Saccharose enthält. Es werden eine entsprechende Anzahl an Blue-Cap-Röhrchen mit je 5 mL Saccharose-Lösung befüllt, sodass der Überstand aus der ersten Zentrifugation mit einem Volumen von 2,5 bis 3,0 mL pro Röhrchen komplett aufgetragen werden kann. Beim Auftragen muss darauf geachtet werden, dass der vorgelegte Puffer langsam mit der Probe überschichtet wird und nicht durch zu schnelles Pipettieren aufgewirbelt wird. Es sollte eine deutliche Phasengrenze erkennbar sein. Ist die Probe auf die Röhrchen aufgeteilt, wird für 10 min bei 700 g und 4°C zentrifugiert. Die Mitochondrienfraktion befindet sich nach wie vor ganz oben im Röhrchen, mit dem Unterschied, dass die Phasengrenze nicht mehr eindeutig erkennbar ist und sich unten im Röhrchen ein Pellet befindet, das Zelltrümmer enthält. Den oberen



rötlich gefärbten Teil vorsichtig mit der Pipette aus allen Röhrchen abziehen und in einem frischen Blue-Cap sammeln. Die so gewonnene Mitochondrienfraktion wird anschließend bei 10.000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um die Mitochondrien zu sedimentieren. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird zwei Mal mit jeweils 1 mL Homogenisierungspuffer gewaschen. Zum Schluss wird das Mitochondrienpellet je nach Größe in 1 bis 2 mL Lagerlösung aufgenommen und darin resuspendiert. Zur Lagerung der Mitochondrien-suspension wird die Lösung mit einem Volumen von je 100 µL in 0,2 mL PCR-Gefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend werden die Aliquots bei -80°C gelagert.

**Tab. 4.2:** Zusammensetzung der zur Isolierung von Mitochondrien aus Rattenleber benutzten Puffer und Lösungen.

<b>Homogenisierungspuffer</b>		<b>Saccharoselösung</b>	
50 mM	Tris / HCl pH 7,4	50 mM	Tris / HCl pH 7,4
5 mM	EDTA	5 mM	EDTA
250 mM	Saccharose	350 mM	Saccharose
in MilliQ, steril		in MilliQ, steril	
2% (v/v) SCAVEGR™ (frisch hinzugeben)		0,5 mM Pefabloc SC® (frisch hinzugeben)	
0,5% (v/v) PIC (frisch hinzugeben)			

<b>Lagerlösung</b>	
50 mM	Tris / HCl pH 7,4
250 mM	Saccharose
in MilliQ, steril	
2% (v/v) SCAVEGR™ (frisch hinzugeben)	
0,5% (v/v) PIC (frisch hinzugeben)	

#### 4.1.3 Isolierung der Mitochondrien aus Rattenherz

Das Besondere bei Muskelgewebe, ob Skelett- oder Herzmuskel, ist das Vorkommen von zwei verschiedenen Mitochondrienpezies innerhalb der Muskelzellen. Es handelt sich hierbei um subsarcolemmale Mitochondrien, die sich direkt unter der Cytoplasmamembran befinden, und um interfibrilläre Mitochondrien, die zwischen den Muskelfibrillen lokalisiert sind<sup>[76]</sup>. Um beide Spezies getrennt voneinander isolieren zu können, erfolgt eine zweigeteilte Präparation, die direkt hintereinander am gleichen Tag ausgeführt werden muss. Durch Zugabe des Enzyms Nagarse, einer Serin-Protease, können die Muskelfibrillen angedaut und die Mitochondrien zwischen ihnen freigesetzt werden<sup>[76]</sup>. Da Nagarse mittlerweile nicht mehr kommerziell erhältlich ist, wurde eine dazu analoge bakterielle Protease (Proteinase, bacterial Type XXIV, P8038) von Sigma verwendet.

---

Alle nachfolgenden Schritte zur Isolierung der Mitochondrien aus Rattenleber werden entweder auf Eis oder bei 4°C durchgeführt, zum Einsatz kommende Gerätschaften und Behältnisse werden vorgekühlt und mit MilliQ gespült. Zu verwendende Puffer werden vor Gebrauch mit PIC (Protease-Inhibitor-Cocktail) oder mit Pefabloc SC® (Cystein- und Serin-Protease-Inhibitor) versetzt.

#### 4.1.3.1 Isolierung der subsarcolemmalen Mitochondrien

Die Gewebeproben werden aufgetaut, gewogen und mit einem Skalpell in so kleine Stückchen wie möglich geschnitten. Da Muskelgewebe ein sehr starkes und festes Gewebe ist, erleichtert eine gründliche Zerkleinerung mit dem Skalpell die sich daran anschließende Homogenisierung. Diese wird portionsweise mit einem Puffer-zu-Gewebeverhältnis von 10:1 (v/w) durchgeführt. Dazu werden jeweils ca. 200 bis 300 mg zerkleinertes Gewebe in einen 2 mL *tight-fit* Glas-Teflon-Homogenisator überführt und mit 2 bis 3 mL eisgekühlten Puffer A versetzt. Die Homogenisierung wird bei 1.100 rpm mit 9 Hüben durchgeführt. Die auf diese Weise gewonnenen Homogenisate werden in einem Blue-Cap vereint. Die Apparatur wird mit 1 mL Puffer A gespült und dieser wird ebenfalls zu dem Homogenisat gegeben. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 10 min bei 500 *g* und 4°C, um größere Bestandteile wie Zelltrümmer und Zellkerne zu sedimentieren. Der Überstand wird abgenommen und in ein steriles Blue-Cap gegeben. Das Zelltrümmer enthaltende Sediment wird zwei Mal mit je 2 mL Puffer A resuspendiert und erneute bei gleicher *g*-Zahl und gleicher Zeit zentrifugiert. Die hieraus erhaltenen Überstände werden mit dem zuvor abgenommenen Überstand vereinigt. Das gewaschene Sediment wird auf Eis aufbewahrt, um im Anschluss die Isolierung der interfibrillären Mitochondrien durchführen zu können.

Die vereinten Überstände werden nun bei 3.000 *g* für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um die subsarcolemmalen Mitochondrien zu sedimentieren. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird zwei Mal gewaschen. Der erste Waschgang erfolgt mit 1 mL Puffer A, der zweite mit 1 mL Puffer A<sub>1</sub>. Die beiden Puffer sind bis auf 0,2% (w/v) BSA in Puffer A identisch. Das BSA soll während der Homogenisierung als Konkurrenzprotein für oxidative Modifikationen Schäden an mitochondrialen Proteinen reduzieren. Da zusätzlich eingebrachtes Protein allerdings die Proteinbestimmung der Mitochondriensuspension verfälschen kann, soll BSA nicht in dem Puffer, der zur Lagerung der Mitochondrien verwendet wird, vorhanden sein. Daher wird der letzte Waschschrift bereits mit Puffer A<sub>1</sub> durchgeführt, um BSA-Reste aus Puffer A in der Suspension zu entfernen. Nach dem Waschen wird das Pellet je nach Größe in 2 bis 3 mL Puffer A<sub>1</sub> resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

**Tab. 4.3:** Zusammensetzung der zur Isolierung von subsarcolemmalen Mitochondrien aus Rattenherz benutzten Puffer.

<b>Puffer A</b>		<b>Puffer A<sub>1</sub></b>	
5 mM	MOPS pH 7,4	5 mM	MOPS pH 7,4
220 mM	Mannitol	220 mM	Mannitol
70 mM	Saccharose	70 mM	Saccharose
2 mM	EGTA	0,5 mM	EGTA
0,2% (w/v)	BSA	in MilliQ, steril	
in MilliQ, steril		0,5% (v/v) PIC (frisch hinzugeben)	
0,5% (v/v) PIC (frisch hinzugeben)			

#### 4.1.3.2 Isolierung der interfibrillären Mitochondrien

Das Sediment aus der Isolierung der subsarcolemmalen Mitochondrien, das Zelltrümmer und die darin eingeschlossenen interfibrillären Mitochondrien enthält, wird je nach Größe in 2 bis 3 mL Puffer B resuspendiert und kurz auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit werden 8 mL Puffer B in ein Blue-Cap vorgelegt und ebenfalls auf Eis gestellt. Das Resuspensat wird nun in den Homogenisator überführt und sofort mit der bakteriellen Protease versetzt. Hierfür wird pro Gramm Ausgangsgewebe 5 mg des Enzyms hinzugegeben, wobei die Stammlösung das lyophilisierte Enzym enthält, das mit einer Konzentration von 25 mg/mL in Puffer B<sub>1</sub> gelöst wurde. Eine erneute Homogenisierung des Gewebes mit 9 Hüben bei 1.100 rpm sorgt für eine schnelle Verteilung der Protease in der Gewebesuspension und gleichzeitig für mechanische Unterstützung beim Aufbrechen der Muskelfibrillen. Anschließend das Homogenisat sofort in das Blue-Cap mit dem vorgelegten Puffer B überführen und gut mischen. Dies dient zur Konzentrationssenkung des Enzyms und damit dem Verlangsamen des Verdaus. Die Apparatur mit 1 mL Puffer B spülen und diesen mit dem Homogenisat vereinen. Das Röhrchen wird umgehend für 5 min bei 5.000 g und 4°C zentrifugiert, um die Protease im Überstand zu sammeln. Vom Zeitpunkt der Enzymzugabe bis zur Zentrifugation sollten idealerweise nicht mehr als 2 bis 3 min vergehen, damit das Enzym nach dem Verdau der Fibrillen nicht anfängt, Proteine der äußeren Mitochondrienmembran zu verdauen.

Nach der Zentrifugation wird der Überstand vorsichtig und möglichst rückstandsfrei abgenommen und verworfen. Das Pellet wird in Puffer B resuspendiert und auf das Ausgangsvolumen nach der ersten Homogenisierung gebracht. Anschließend wird bei 500 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer und Zellkerne zu sedimentieren. Der Überstand wird abgenommen und in einem frischen Blue-Cap gesammelt. Das Pellet wird zwei Mal mit je 2 mL Puffer B gewaschen und die dadurch erhaltenen Überstände werden mit dem der zuvor erfolgten Zentrifugation vereint. Die sich daran anschließende Zentrifugation erfolgt bei 3.000 g für 10 min bei 4°C. Anschließend wird das Mitochondrien-

sediment zwei Mal je nach Größe mit 500 bis 700 µL Puffer gespült. Für den ersten der beiden Waschgänge wird Puffer B, für den zweiten Puffer B<sub>1</sub> verwendet, um den Rest BSA aus Puffer B aus dem Mitochondrienpellet herauszuwaschen. Nach dem Waschen wird das Pellet ein letztes Mal mit Puffer B<sub>1</sub> resuspendiert, je nach Größe mit einem Volumen von 500 bis 1.200 µL. Im Anschluss wird die Mitochondriensuspension aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

**Tab. 4.4:** Zusammensetzung der zur Isolierung von interfibrillären Mitochondrien aus Rattenherz benutzten Puffer.

<b>Puffer B</b>		<b>Puffer B<sub>1</sub></b>	
50 mM	MOPS pH 7,4	50 mM	MOPS pH 7,4
100 mM	KCl	100 mM	KCl
2 mM	EGTA	0,5 mM	EGTA
0,2% (w/v)	BSA	in MilliQ, steril	
in MilliQ, steril		0,5% (v/v) PIC (frisch hinzugeben)	
0,5% (v/v) PIC (frisch hinzugeben)			

#### 4.1.4 Isolierung der Mitochondrien aus Rattenhirn

Die Isolierung der Mitochondrien aus Rattenhirn wurde von Frau Dr. Diksha Dani durchgeführt. Die Protokolle der angewendeten Isolierungsschritte und der verwendeten Lösungen und Puffer sind in der Diplomarbeit (2010)<sup>[91]</sup> von Michaela Söhn nachzulesen, die die Proben im Rahmen ihrer Diplomarbeit unter meiner Anleitung weiterverwendet hat.

## 4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung des Proteingehalts in Lösungen. Sie beruht auf einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 in Anwesenheit von Proteinen<sup>[94]</sup>. Der Farbstoff kann an kationische und nichtpolare, hydrophobe Aminosäureseitenketten binden, wodurch es zu einer Absorptionsabnahme bei 465 nm und einer gleichzeitigen Absorptionszunahme bei 595 nm kommt. Durch Messen der Absorptionen beider Wellenlängen und deren Relation zueinander kann mit Hilfe einer BSA-Standardreihe die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmt werden<sup>[94]</sup>.

Alle weiteren Details zur Durchführung der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford können in meiner Diplomarbeit<sup>[92]</sup> nachgelesen werden.

---

### 4.3 Solubilisierung mitochondrialer Membranproteine

Um mitochondriale Membranproteine aus der Membran herauszulösen, wird in dieser Arbeit das nicht-ionische milde Detergens Digitonin verwendet. Digitonin ist ein Steroid-Glykosid und wird als Naturstoffextrakt aus dem Samen des Roten Fingerhuts, *Digitalis purpurea*, gewonnen.

Detergenzien im Allgemeinen und Digitonin im Besonderen können aufgrund ihrer Struktur in Lipiddoppelschichten interkalieren und führen dort je nach Konzentration zu einer Permeabilitätssteigerung oder zum Auflösen der Membranstruktur. Digitonin kann durch Anlagerung um die hydrophoben Bereiche der Proteine ihre Quartärstruktur stabilisieren und damit eine native Isolierung von Membranproteinkomplexen und -superkomplexen ermöglichen.

Die bei -80 °C gelagerte Suspension der zu solubilisierenden Mitochondrien wird auf Eis aufgetaut und anschließend mit 300 µL Solubilisierungspuffer versetzt, der kein Detergens enthält. Eine Zentrifugation bei 20.817 g (14.000 rpm mit Rotor F45-30-11) für 8 min bei 4 °C bewirkt einen Pufferwechsel, da der Überstand komplett abgenommen und verworfen wird. Das Mitochondrienpellet wird in dem der Menge entsprechendem Volumen an eisgekühltem Solubilisierungspuffer mit 0,5% PIC resuspendiert. Anschließend wird 10%ige (w/v) Digitoninlösung zugegeben, sofort gevortext und die Probe für 30 min auf Eis inkubieren lassen. Während der Inkubation wird die Probe alle 10 min durch Vortexen gemischt, damit eine gleichmäßige Verteilung des Digitonins gewährleistet ist. Im Anschluss wird die Probe für 10 min erneut bei 20.817 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthält neben Lipiden und Detergensmolekülen die solubilisierten Proteine und wird restlos abgenommen und in ein frisches, vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Probe kann nun auf ein blau-natives Gel aufgetragen werden.

Das Gesamtvolumen des Solubilisierungsansatzes ist abhängig von dem einzusetzenden Detergens-zu-Protein-Verhältnis und der Proteinmenge, die solubilisiert werden soll. In allen Ansätzen müssen Endkonzentrationen von 1% (w/v) Digitonin, 0,5% (v/v) PIC und 1x Solubilisierungspuffer herrschen.

Da nicht für alle Gewebe und alle Organismen ein einheitliches Detergens-zu-Protein-Verhältnis verwendet werden kann, muss vor den Experimenten abgeklärt werden, welches Verhältnis für das zu untersuchende Gewebe hinsichtlich Solubilisierungseffizienz und Erhaltung der supramolekularen Proteinstrukturen am besten ist. Dazu sollte die Probe mit verschiedenen Detergens-zu-Protein-Verhältnissen solubilisiert und auf ein BN-Gel

---

aufgetragen werden, um anhand des Bandenmusters zu entscheiden, welches Verhältnis für die geplanten Experimente das Optimum ist.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Geweben aus Ratte werden für die Leber und das Hirn jeweils ein Verhältnis von 8 g Detergens pro g Protein gewählt, für Herzmitochondrien wird ein Verhältnis von 4 g/g verwendet. Rinderherzmitochondrien (bovine heart mitochondria, BHM) werden mit 3 g/g solubilisiert.

**Tab. 4.5:** Zusammensetzung der benötigten Puffer und Lösungen für die Solubilisierung mitochondrialer Proteine.

2x Solubilisierungspuffer		Digitoninlösung	
60 mM	HEPES / NaOH, pH 7,4	10% (w/v)	Digitonin
300 mM	Kaliumacetat	in MilliQ, bei 95 °C lösen, vor jeder	
20% (w/v)	Glycerin	Solubilisierung frisch zubereiten	
in MilliQ, steril			

## 4.4 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

### 4.4.1 Glycin-SDS-PAGE

Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) ist ein Detergens, das Proteine denaturiert, indem es sich an hydrophobe Bereiche anlagert. Dies geschieht bei wasserlöslichen Proteinen in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1,4 g SDS pro Gramm Protein, was etwa einem SDS-Molekül pro zwei Aminosäuren entspricht. Durch die negative Ladung des SDS-Protein-Komplexes, die die Eigenladung des Proteins maskiert, und das konstante Masse-zu-Ladung-Verhältnis können monomere Proteine und Proteinkomplex-Untereinheiten nach Anlegen einer Spannung gemäß ihrer Masse aufgetrennt werden.

Die Glycin-SDS-PAGE nach Laemmli (1970)<sup>[95]</sup> ist eine diskontinuierliche Gelelektrophorese, das heißt, das Gel besteht aus zwei verschiedenen Komponenten, einem engmaschigen Trenngel und einem großporigen Sammelgel, die unterschiedliche pH-Werte besitzen. Bei einem pH-Wert von 6,8, der im Sammelgel herrscht, liegt das Glycin netto quasi ungeladen als Zwitterion vor und bewegt sich nur äußerst langsam durch das Gel. Die im Sammelgelpuffer befindlichen Chlorid-Ionen sind unabhängig vom pH-Wert negativ geladen und wandern bei Anlegen einer Spannung sehr schnell zur Anode. Zwischen diesen beiden Ionenspezies entsteht im Sammelgel an der Lauffront ein Feldstärkegradient, in dem sich die Proteine dem Prinzip der Isotachophorese folgend entsprechend ihrer Ladung anordnen. Hierbei kommt es zu einer Konzentrierung der Proteine. Tritt die Lauffront in das Trenngel

ein, kommt es durch einen pH-Sprung auf 8,8 zu einer Deprotonierung des Glycins und damit zum Auflösen des Feldstärkegradienten. Nun werden die Proteine nach ihrer Masse aufgetrennt.

Die in dieser Arbeit hergestellten SDS-Gele weisen ein Außenmaß von 8,2 cm x 10,0 cm (H x B) und eine Dicke von 1,5 mm auf. Das Trenngel besitzt eine Totalacrylamidkonzentration von  $T = 13\%$  und einen Vernetzungsgrad von  $C = 4\%$ , während das Sammelgel  $T = 5\%$  und  $C = 3,3\%$  aufweist. Das Pipettierschema ist Tabelle 4.6 zu entnehmen.

**Tab. 4.6:** Zusammensetzung der Gel-Lösungen für 2 SDS-Gele mit einer Dicke von 1,5 mm.

Trenngel		Sammelgel	
Gel A [mL]	8,32	Gel A/B 29:1 [mL]	1,25
Gel B [mL]	5,2	8x Sammelgelpuffer [mL]	1,25
4x Trenngelpuffer [mL]	5	dest. VE H <sub>2</sub> O [mL]	7,34
dest. VE H <sub>2</sub> O [mL]	1,2	20% (w/v) SDS [μL]	50
20% (w/v) SDS [μL]	100	APS [μL]	100
APS [μL]	150	TEMED [μL]	10
TEMED [μL]	15	Gesamtvolumen [mL]	10
Gesamtvolumen [mL]	20		

Als Vorbereitung der Proteinproben für die SDS-Gelelektrophorese werden diese 1:1 mit SDS-Auftragspuffer vermischt. Dieser enthält sowohl SDS, das die Denaturierung der Proteine bewirkt, als auch  $\beta$ -Mercaptoethanol, das im Protein vorhandene Disulfidbrücken reduziert. Anschließend werden die Proben auf das Gel aufgetragen und es wird sofort eine Spannung angelegt. Da hier die Spannung, nicht aber die Stromstärke der limitierende Faktor sein soll, wird 100 V für den Durchtritt durch das Sammelgel und 130 V ab dem Eintritt in das Trenngel gewählt.

**Tab. 4.7:** Zusammensetzung der Puffer für die SDS-Gelelektrophorese.

4x SDS-Trenngelpuffer		8x SDS-Sammelgelpuffer	
1,5 M	Tris / HCl pH 8,8	1 M	Tris / HCl pH 6,8
in dest. VE H <sub>2</sub> O		in dest. VE H <sub>2</sub> O	

SDS-Auftragspuffer		Elektrophoresepuffer	
15% (w/v)	Saccharose	50 mM	Tris
2,5% (w/v)	SDS	400 mM	Glycin
0,25% (w/v)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,1% (w/v)	SDS
0,04% (w/v)	Bromphenolblau	in dest. VE H <sub>2</sub> O, pH 8,5 stellt sich ein	
25 mM	Dithiothreitol		
in dest. VE H <sub>2</sub> O			

---

#### 4.4.2 Blau-native PAGE

Die blau-native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) erlaubt eine native Auftrennung von Proteinen, Proteinkomplexen und -superkomplexen. Um sicherzustellen, dass alle Proteine in das Gel einlaufen und zur Anode wandern, braucht es einen Ladungsträger, der die Eigenladung der Proteine maskiert. Diese Funktion übernimmt in der BN-PAGE der dem Kathodenpuffer zugesetzte blaue Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250, der sich an kationische und nichtpolare, hydrophobe Aminosäureseitenketten anlagert. Auf diese Weise ist eine native Trennung unter Beibehaltung der Konformation und Funktion der Proteine und Proteinkomplexe möglich<sup>[96]</sup>.

BN-Gele sind in der Regel Gradientengele, da der Trennbereich unter nativen Bedingungen sehr groß ist. Dieser liegt gewöhnlich zwischen ca. 200 kDa bis hin zu 3 bis 4 MDa. Ein Gradient stellt hier sicher, dass große Proteinkomplexe in das Gel einlaufen können, kleine Proteine aber wegen ihrer erhöhten Mobilität das Gel nicht zu schnell passieren und dadurch verloren gehen.

In dieser Arbeit werden stets große BN-Gele mit einem Außenmaß von 16 cm x 18 cm (H x B) und einer Dicke von 1,5 mm hergestellt. Es wird ein Gradient von 4% bis 13% Totalacrylamidkonzentration verwendet, während das Sammelgel eine Totalacrylamidkonzentration von  $T = 3,5\%$  aufweist. Der Vernetzungsgrad beträgt jeweils  $C = 3\%$ . Da es sich bei allen bearbeiteten Proben um tierische Mitochondrien handelt, wird das Imidazol-Puffersystem verwendet.

Die Details der Methodik wie das Gießen eines BN-Gels und die Durchführung einer BN-PAGE habe ich bereits in meiner Diplomarbeit<sup>[92]</sup> beschrieben und können dort nachgelesen werden.

#### 4.4.3 2D-Tricin-SDS-PAGE

In einer 2D-SDS-PAGE werden Proteine und Proteinkomplexe aus einem Gelstreifen eines BN-Gels mittels Inkubation mit 1% (w/v) SDS und 1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol denaturiert. Anschließend wird der Gelstreifen in eine Gelapparatur um 90° gedreht eingebaut und durch eine SDS-PAGE werden die Untereinheiten der Proteine und Proteinkomplexe aufgetrennt. Dabei wandern sie in einer vertikalen Linie unterhalb des dazugehörigen Proteinkomplexes der ersten Dimension, was eine leichte Zuordnung der Untereinheiten zu den Proteinkomplexen und -superkomplexen erlaubt.



---

Die in dieser Arbeit angefertigten 2D-SDS-Gele haben alle eine Größe von 16 cm x 18 cm und bestehen aus drei verschiedenen Gelen. Bei den Gelen handelt es sich von unten nach oben um ein Trenngel mit einer Totalacrylamidkonzentration von  $T = 13\%$ , einem denaturierenden Sammelgel und einem nativen Sammelgel mit jeweils  $T = 5\%$ . Der Vernetzungsgrad liegt bei allen drei Gelen bei  $C = 3\%$ .

Die weiteren Details zur Vorbereitung und Durchführung dieser Methodik wurden von mir bereits in meiner Diplomarbeit<sup>[92]</sup> beschrieben und können in dieser nachgelesen werden.

## 4.5 Gelfärbemethoden

### 4.5.1 Roti<sup>®</sup>-Blue-Färbung

Roti<sup>®</sup>-Blue ist eine Färbelösung, die kolloidales Coomassie Brilliant Blue G-250 enthält. Durch die kolloidalen Eigenschaften soll laut Hersteller die Nachweisgrenze auf  $<30$  ng Protein pro Bande gegenüber herkömmlichen Coomassie-Färbelösungen mit 50 bis 100 ng<sup>[97]</sup> gesenkt werden.

Mit Roti<sup>®</sup>-Blue können Proteine sowohl in BN-Gelen als auch in SDS-Gelen angefärbt werden. Hierfür wird das Gel mit Färbelösung bedeckt und bis zur gewünschten Farbeintensität bei Raumtemperatur darin geschüttelt. Eine sich daran anschließende, unter Umständen mehrmalige Inkubation mit Entfärber reduziert die Hintergrundfärbung. Färbt man SDS-Gele mit Roti<sup>®</sup>-Blue, müssen diese vor der eigentlichen Färbung für mindestens 15 min unter Schütteln in Entfärber inkubieren. Dieser zusätzliche Schritt soll das SDS aus dem Gel herauswaschen, da dieses die Bindung von Coomassie Brilliant Blue an die Proteine stört.

**Tab. 4.8:** Für die Roti<sup>®</sup>-Blue-Färbung verwendete Lösungen.

Roti <sup>®</sup> -Blue Färbelösung		Entfärbelösung	
20% (v/v)	Roti <sup>®</sup> -Blue 5x Konzentrat	25% (v/v)	Methanol
20% (v/v)	Methanol	in dest. VE H <sub>2</sub> O	
in dest. VE H <sub>2</sub> O			

---

#### 4.5.2 SYPRO® Ruby-Färbung

Bei SYPRO® Ruby handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der Proteine durch Anlagerung an Protein-SDS-Komplexe anfärbt. Ein wesentlicher Vorteil dieser Färbemethode gegenüber einer gewöhnlichen Coomassie- oder Silberfärbung ist der äußerst hohe dynamische Bereich bei der Anfärbung der Proteine. Dieser Bereich erstreckt sich über drei bis vier Größenordnungen. Gleichzeitig ist er mit einer Nachweisgrenze von 1 bis 2 ng pro Proteinbande oder Spot<sup>[98]</sup> ähnlich sensitiv wie eine Silberfärbung<sup>[99]</sup>.

Die Durchführung einer SYPRO® Ruby-Färbung und die anschließende Detektion mittels eines CCD-Kamerasystems habe ich bereits in meiner Diplomarbeit<sup>[92]</sup> beschrieben. Einzige Änderung an der Färbeprozedur für Herz- und Hirnproben ist die Verkürzung der Fixierzeit vor der Färbung von drei Stunden auf eine Stunde. Die auf eine Stunde verkürzte Fixierzeit ist, wie bei Söhn<sup>[91]</sup> beschrieben, völlig ausreichend, um die Gele für die SYPRO® Ruby-Färbung vorzubereiten.

#### 4.5.3 Silberfärbung

Die in dieser Arbeit durchgeführte Silberfärbung ist eine leicht modifizierte Variante nach Blum *et al.* (1987)<sup>[100]</sup>. Generell beruht die Silberfärbung auf einer Anlagerung von Silberionen an Proteine im Gel, die durch ein starkes alkalisches Reduktionsmittel wie Formaldehyd oder Glutaraldehyd zu elementarem Silber reduziert werden. Durch diese Reaktion entsteht in den Proteinspots eine dunkelbraune bis schwarze Färbung, die mittels einer Absenkung des pH-Wertes durch Essigsäure gestoppt werden kann, wenn die gewünschte Färbeintensität erreicht ist.

Die Details der Durchführung einer Silberfärbung wurden von mir bereits in meiner Diplomarbeit<sup>[92]</sup> beschrieben.

#### 4.6 In-Gel-Aktivitätstests

Da BN-Gele in der Lage sind, Proteinkomplexe und deren Superkomplexe nativ unter Erhaltung deren Funktion aufzutrennen, können Aktivitätstest von Enzymen direkt im Gel durchgeführt werden. Voraussetzung hierfür ist eine Reaktion mit Präzipitatbildung, da nur durch Präzipitate an den entsprechenden Banden eine Aktivität angezeigt und den jeweiligen Proteinkomplexen zugeordnet werden kann.

#### 4.6.1 Aktivitätstest für Komplex I

Bei dem Aktivitätstest für Komplex I der Atmungskette enthält der Testpuffer gelbes Nitroblautetrazoliumsalz, das durch die aktive NADH-Dehydrogenase im BN-Gel durch den Transfer von zwei Elektronen von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu violetter Formazan reduziert wird<sup>[101]</sup>. Dieses präzipitiert in den entsprechenden Proteinbanden, die Komplex I-Aktivität zeigen.

Um die Aktivität über die Zeit zu beobachten, wird das zu untersuchende Gel unter Schütteln in Testpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Je nach Geschwindigkeit der Präzipitatbildung wird alle 5 bis 10 min das Gel densitometrisch vermessen (Dauer des densitometrischen Scans: ca. 1 min). Ist der Präzipitatzuwachs pro Zeiteinheit zu hoch, erfolgt die Inkubation in Testpuffer im Kühlschrank. Es werden mindestens zehn Messungen gemacht und danach das Gel bis zur gewünschten Intensität weiter gefärbt. Zum Abstoppen der Reaktion wird der Testpuffer gegen Fixierlösung ausgetauscht und das Gel darin für 15 min geschüttelt. Zum Entfärben des Hintergrunds kann das Gel bis zu einem Tag in dest. VE-Wasser gelagert werden, je nach Entfärbungsgrad, den das Gel erreichen soll.

Soll nur ein qualitativer Test durchgeführt werden, um die Zuordnung von Banden zu erleichtern bzw. um eine Aussage zu treffen, ob Komplex I in der Probe generell Aktivität zeigt oder nicht, wird nur eine densitometrische Messung durchgeführt. Hierfür wird bis zur gewünschten Färbung der Banden in Testpuffer inkubiert, für 15 min in Fixierlösung fixiert, für mindestens 15 min in dest. VE-Wasser äquilibriert und im Anschluss densitometrisch vermessen.

**Tab. 4.9:** Verwendete Puffer und Lösungen zur Durchführung von Aktivitätstests von Komplex I der Atmungskette.

Aktivitätstestlösung Komplex I		Fixierlösung	
100 mM	Tris / HCl pH 7,4	50% (v/v)	Methanol
768 mM	Glycin	10% (v/v)	Essigsäure
0,489 mM	NBT	in MilliQ	
0,1 mM	$\beta$ -NADH		
in MilliQ			

#### 4.6.2 Aktivitätstest für Komplex IV

Bei dem Aktivitätstest für Komplex IV der Atmungskette handelt es sich um eine Redoxreaktion, bei der im Testpuffer befindliches 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) durch Cytochrom c oxidiert wird. Das reduzierte Cytochrom c überträgt Elektronen auf Komplex IV, der Sauerstoff zu Wasser reduziert. Bei der Oxidation von DAB entstehen Polymere aus

DAB-Molekülen, die in den entsprechenden Banden mit Komplex IV-Aktivität ein braunes Präzipitat bilden<sup>[102]</sup>.

Die Durchführung des Aktivitätstests für Komplex IV ist analog zu der des Aktivitätstests für Komplex I.

**Tabelle 4.10:** Zusammensetzung von Fixierlösung und Testpuffer, modifiziert nach Wittig *et al.* (2007)<sup>[102]</sup>.

Aktivitätstestlösung Komplex IV		Fixierlösung	
50 mM	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	50% (v/v)	Methanol
in MilliQ, pH 7,2 einstellen		10% (v/v)	Essigsäure
0,05 mM	Cytochrom c	in MilliQ	
1,58 mM	DAB		

## 4.7 OxyBlot

Oxidative Modifikation von Aminosäuren in Proteinen durch physiologische Prozesse der Zelle, z.B. die Generierung von ROS, spielen eine große Rolle bei diversen zellulären Prozessen wie Altern, Apoptose und bei der Ausbildung von Krankheiten. Eine Form von oxidativen Modifikationen von Proteinen durch ROS besteht in der Carbonylierung von Aminosäureseitenketten. Durch das OxyBlotting ist es möglich, diese Carbonylierungen zu detektieren, indem sie mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu Dinitrophenylhydrazon (DNP) derivatisiert werden und anschließend durch Immunodetektion mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden können.

### 4.7.1 Probenvorbereitung

Die Proteinproben werden 1:1 mit 12% SDS-Lösung verdünnt und anschließend mit dem doppelten ursprünglichen Probenvolumen an Derivatisierungslösung bzw. für die Negativkontrolle mit Kontrolllösung versetzt. Die so hergestellten Proben werden nach einer Inkubationszeit von 15 min mit dem 1,5-fachen Volumen der Proteinprobe an Neutralisationslösung versetzt. Die gleiche Prozedur wird ebenfalls für eine Derivatisierungskontrolle einer BSA-Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml durchgeführt, um zu zeigen, dass eine Derivatisierung der Proben erfolgreich war.

Die auf die Weise hergestellten OxyBlot-Proben setzen sich demnach wie folgt zusammen:  
Proteinprobe bzw. BSA-Lösung : 12% (w/v) SDS-Lösung : Derivatisierungs- bzw. Kontrolllösung : Neutralisationslösung im Verhältnis (v/v) 1 : 1 : 2 : 1,5.

Bevor die fertigen Proben auf ein kleines SDS-Gel aufgetragen werden, wird Probenauftragspuffer zugesetzt. Wenn das Maximalvolumen für eine Geltasche dadurch nicht überschritten wird, liegt das Verhältnis bei 1:1. Beträgt das Volumen der Probe bereits über die Hälfte des Maximalvolumens, wird ein Verhältnis von 2:1 gewählt.

Das in dieser Arbeit verwendete Kit der Firma Chemicon enthält alle notwendigen Lösungen zur Derivatisierung, Kontrolle und Neutralisation, sowie Erst- und Zweitantikörper für die Immunodetektion.

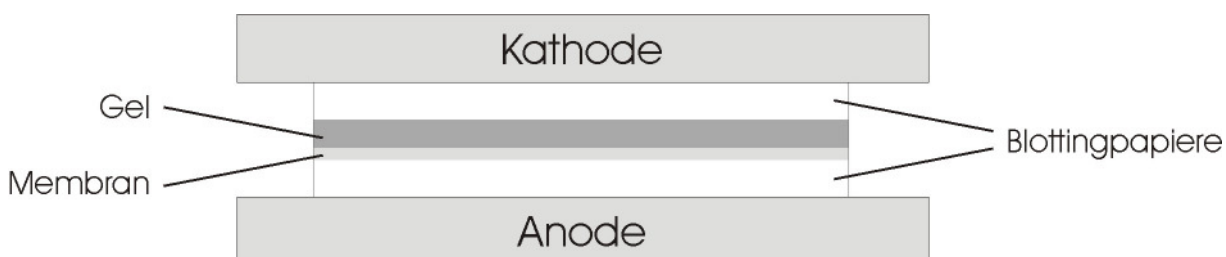
#### 4.7.2 Blotting und Antikörper-Behandlung

Nach dem Gellauf werden die Gele für 15 min unter Schütteln in SDS-Elektrophoresepuffer äquilibriert. In der Zeit zwei Blottingpapiere (Whatman-Paper) und die PVDF(Polyvinylidenfluorid)-Membran auf Gelgröße zuschneiden. Die Blottingpapiere werden mit Anoden-Pufferlösung (Roti®Blot 2A Arbeitslösung) für die Anodenseite bzw. mit Kathoden-Pufferlösung (Roti®Blot 2K Arbeitslösung) für die Kathodenseite getränkt. Die PVDF-Membran wird kurz in 95% Ethanol geschwenkt, um deren Hydrophobizität zu mindern.

**Tab. 4.11:** Verwendete Lösungen für das Semi-Dry-Blotting.

Roti®-Blot 2A Arbeitslösung		Roti®-Blot 2K Arbeitslösung	
10% (v/v)	10x Roti®-Blot 2A	10% (v/v)	10x Roti®-Blot 2K
5% (v/v)	Methanol p.a.	20% (v/v)	Methanol p.a.
in dest. VE H <sub>2</sub> O		in dest. VE H <sub>2</sub> O	

Zum Blotten wird eine Semi-Dry-Blotting-Apparatur von Biorad benutzt. Auf die Anodenplatte werden die Komponenten nacheinander wie in Abbildung 4.1 gezeigt luftblasenfrei und nass übereinander geschichtet. Nach Aufsetzen der Kathode wird für 45 min bei 25 V und 1 mA/cm<sup>2</sup> (~65 mA pro Gel) geblottet.



**Abb. 4.1:** Schematischer Aufbau der Einzelkomponenten bei der in dieser Arbeit verwendeten Semi-Dry-Blotting-Apparatur.

Nach dem Blotten werden die Gele mit RotiBlue gefärbt und die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur in je 20 ml Block-/Verdünnungspuffer geschüttelt. Anschließend werden die Blots mit dem Erstantikörper für 1 h unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Bei der Antikörperlösung handelt es sich um den im Kit enthaltenen Antikörper gegen Dinitrophenylhydrazon, der 1:150 mit Block-/Verdünnungspuffer verdünnt wird. Es werden jeweils 15 mL Lösung pro Blot verwendet. Nach Beendigung der Antikörper-Behandlung werden die Blots unter Schütteln mehrmals mit PBS-T gewaschen. Dabei wird anfangs 2x kurz gespült, danach 1x für 15 min und abschließend für 2x 5 min gewaschen. Für die Inkubation mit dem Zweitantikörper wird dieser 1:300 mit Block-/Verdünnungspuffer verdünnt und anschließend wird jeder Blot in 15 mL dieser Antikörperlösung für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach erneutem Waschen mit PBS-T (2x kurz spülen, 1x 15 min, 2x 5 min) erfolgt die Detektion.

**Tab. 4.12:** Zusammensetzung der für die Antikörperbehandlung verwendeten Puffer.

<b>10x Phosphate Buffered Saline (PBS<sub>Oxy</sub>)</b>		<b>PBS-T</b>	
188 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,05% (w/v)	Tween
810 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	in 1x PBS <sub>Oxy</sub>	
1,45 M	NaCl		
in dest. VE H <sub>2</sub> O, pH 7,2 - 7,4		<b>Block-/Verdünnungspuffer</b>	
		1% (w/v)	BSA
		in PBS-T	

#### 4.7.3 Chemilumineszenz-Detektion

Da es sich bei dem Zweitantikörper des OxyBlot-Kits um ein Konjugat mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) handelt, erfolgt die Detektion der an die Membran gebundenen Antikörper mittels Chemilumineszenz. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid zur gebundenen HRP wird das im Reaktionspuffer enthaltene Luminol zu 3-Aminophthalat umgesetzt, das sich in einem elektronisch angeregten Zustand befindet. Durch Emission eines Photons gelangt das Molekül wieder in seinen Grundzustand.

Das in dieser Arbeit verwendete Luminol-Reagenz wurde vor der Detektion unter Ausschluss von Licht selbst frisch angesetzt und sofort auf der Blottingmembran verteilt, pro Blot ein Volumen von 2,5 mL. Nach einer kurzen Inkubationszeit von ca. ein bis zwei Minuten wird das Chemilumineszenz-Signal durch das CCD-Kamera-System Luminescent Image Analyzer LAS-3000 von FujiFilm detektiert. Dabei werden folgende Geräteeinstellungen gewählt: Programm Lite, Increment 10s, Chemilumineszenz, kein Licht, Tray-Position 1.

**Tab. 4.13:** Zusammensetzung des Luminol-Reagenz für die Detektion der Chemilumineszenz von HRP-konjugierten Antikörpern.

<b>Luminol-Reagenz zur Chemilumineszenz-Detektion</b>	
100 mM	Tris/HCl pH 8,8
1,25 mM	Luminol
2 mM	4-Iodophenylboronsäure
15,9% (v/v) in MilliQ	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

#### 4.7.4 Stripping der Blotmembran

Als 'Stripping' bezeichnet man das Herunterwaschen der Antikörper von einer Blotmembran. Dies empfiehlt sich, wenn nach einer Chemilumineszenz-Detektion eine weitere Antikörperbehandlung folgen soll. Dazu werden die zu strippenden Membranen 2x 30 min in PBS-T gewaschen, anschließend mit Roti®Free Stripping Puffer bedeckt und für 30 min bei 56°C unter Schütteln inkubiert. Daran schließt sich ein weiterer Waschschrift von 2x 20 min in PBS<sub>Oxy</sub> an. Nun sind die Blotmembranen wieder bereit für eine erneute Behandlung mit Antikörpern. Beim Stripping muss beachtet werden, dass bei diesem Vorgang nicht nur die zuvor gebundenen Antikörper entfernt werden, sondern auch ein Teil der an die Membran assoziierten Proteine verloren geht. Daher kann das Stripping nicht beliebig oft wiederholt werden. Bereits ab der dritten Behandlung können die erzielten Ergebnisse als nicht mehr aussagekräftig betrachtet werden.

#### 4.7.5 Detektion mit Alkalischer Phosphatase

Bei der Detektion mit Alkalischer Phosphatase (AP) macht man sich die Eigenschaft des Enzyms zunutze, unter basischen Bedingungen Phosphorsäureester spalten zu können. In diesem Fall wird der Phosphorsäureester 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) in den entsprechenden Alkohol und Phosphat hydrolysiert. Durch eine Keto-Enol-Tautomerisierung des Alkohols wird dessen Dimerisierung ermöglicht, wobei gleichzeitig das im Reaktionspuffer vorhandene Nitroblautetrazoliumsalz (NBT) zu violetterm Diformazan reduziert wird. Dieses präzipitiert am Entstehungsort und markiert damit diejenigen Proteinbanden auf der Membran, an denen eine Antikörperbindung stattgefunden hat.

Nach Schütteln für 1 h in Block-/Verdünnungspuffer kann die Bindung des Erstantikörpers an die Membran erfolgen. Hier wird wieder der im OxyBlot-Kit enthaltene Antikörper gegen DNP in einer 1:150 Verdünnung verwendet. Jede Membran wird in 15 mL der Antikörperlösung

unter konstantem Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wird eine Reihe von Waschschritten mit PBS-T durchgeführt, um die ungebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen. Es wird 2x kurz gespült, 1x für 15 min und abschließend 2x für 5 min gewaschen. Die daran anschließende Behandlung mit dem Zweitantikörper erfolgt unter Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur. Bei dem Antikörper handelt es sich um ein AP-Konjugat aus Maus, anti-rabbit, 1:2000 in PBS von Pierce verdünnt. Pro Blot werden ca. 25 mL verwendet. Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wird die Membran zunächst 2x 5 min in PBS<sub>Oxy</sub> gewaschen, dann für 5 min in Puffer A geschüttelt, um ein basisches Milieu für die Alkalische Phosphatase zu schaffen. Für die eigentliche Färbung wird die Membran ohne zu schütteln in 10 mL Detektionslösung inkubiert, bis die zu erwartenden Proteinbanden gut sichtbar sind. Das Stoppen der Reaktion erfolgt durch Abgießen der Detektionslösung und 5 min Waschen mit dest. VE-Wasser.

**Tab. 4.14:** Lösungen für die Detektion mit Alkalischer Phosphatase.

Puffer A	
100 mM	Tris
10 mM	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O
100 mM	NaCl
in dest. VE H <sub>2</sub> O, pH 9,5	

Detektionslösung	
37,5 µL	BCIP; 5% (w/v) in DMF
50 µL	NBT; 7,7% (w/v) in 70% (v/v) DMF
in 10 mL Puffer A	

## 4.8 Quantifizierung von Proteinen

### 4.8.1 Quantifizierung mittels Quantity One

In dieser Arbeit wurde die Software Quantity One zum Auswerten von 1D-BN-Gelen oder herkömmlichen SDS-Gelen genutzt, um Unterschiede in der Menge der auf die Gele aufgetragenen Proteine zu detektieren. Da das Programm leider nicht in der Lage ist, die optische Dichte der gesamten Spur auszugeben, muss diese über den prozentualen Anteil einer Bande berechnet werden. Hierfür werden die zu untersuchenden, mit Coomassie Brilliant Blue gefärbten Gele, densitometrisch vermessen und die dadurch entstandene Datei in das Programm eingeladen. Durch Anlegen eines Bandengitters können die Spuren, die für die Analyse herangezogen werden sollen, definiert werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Gitterlinien mittig über der Proteinspur liegen. Falls dies nicht der Fall ist, können durch Addition von beliebig vielen Ankerpunkten in das Gitter die Spurmarkierungen exakt über die Proteinspur gelegt werden. Weiterhin ist darauf zu achten, dass der Markierungsbereich für alle auszuwertenden Spuren denselben Start- und Endpunkt hat. Nach Abzug des



---

Hintergrundes durch das Bestimmen der 'Rolling Disk Size' des Tools 'Background' und Anpassung der Spurbreite unter 'Lane Width', können eine oder mehrere Banden in den Spuren ausgewählt werden. Die Ausdehnung der Bande in der Vertikalen ist in diesem Fall irrelevant, da diese nicht absolut quantifiziert wird, sondern nur ein relatives Verhältnis aufzeigen soll. Die Funktion 'All Lanes Report' zeigt mit der Spalte 'Trace' (Einheit OD x mm) die optische Dichte der ausgewählten Bande an. Um nun den relativen Anteil der Bande an der Gesamtspur anzeigen lassen zu können, wird nach einem Klick auf die rechte Maustaste auf der entsprechenden Bande der Menüpunkt 'Band Information' ausgewählt. Unter dem Punkt 'relative Quantity' findet sich der Anteil in Prozent. Durch Dreisatz ist mithilfe dieses Anteils und der OD der Bande die Berechnung der optischen Dichte der gesamten Spur möglich. Durch Vergleich der Werte verschiedener Spuren lassen sich demnach Rückschlüsse auf die aufgetragene Proteinmenge ziehen.

#### **4.8.2 Quantifizierung mittels Delta2D**

Das Vorgehen bei der Quantifizierung von Proteinspots in mit SYPRO® Ruby gefärbten 2D-Gelen mittels der Software Delta2D wurde bereits in den Diplomarbeiten von Frenzel<sup>[103]</sup> und Schäfer<sup>[104]</sup> ausführlich beschrieben.

Zusätzlich zu erwähnen ist die Unterscheidung zwischen zu löschenden detektierten Spots und zu versteckenden detektierten Spots. Da das Programm Proteinspots anhand von Ansammlungen von Grauwerten definiert, werden auch die Ränder der Gele und Farbstoffartefakte auf dem Gel als Proteinspots detektiert. Da es sich in diesem Fall um keine echten Proteinspots handelt, müssen diese markiert und von dem Gel gelöscht werden. Würden diese falschen Proteinspots wie jene, die echte Proteinspots sind, aber nicht von Interesse sind, über die 'Hide'-Funktion versteckt werden, werden sie von der Software in die Gesamtsumme aller Grauwerte auf dem Gel miteingerechnet. Für die 2D-Gele der Rattenherz-Proben wird die Gesamtsumme als Grundlage für die Normierung herangezogen, daher ist hier die richtige Verwendung der 'Cancel'- und 'Hide'-Funktion besonders wichtig.

Die in dieser Arbeit angefertigten Aktivitätstests wurden ebenfalls mithilfe der Software Delta2D ausgewertet. Hierfür wurden die auszuwertenden Banden ausgewählt und mittels des 'Spot Editing'-Tools die Bandengrenzen so gesetzt, dass sich die komplette Bande innerhalb der Grenzen befindet. Hat man dies für alle Spuren und alle Gele durchgeführt, können die Absolutwerte in Grauwerteinheiten (GU) der 'Quantitation Table' unter dem Karteireiter 'All Gel Images' entnommen werden.

---

Der Vorteil dieser Software gegenüber der eigentlichen Auswertungssoftware für die erste Dimension Quantity One (Kapitel 4.8.1) besteht in dem genauen Festlegen der Bandengrenzen, das bei Quantity One nicht möglich ist.

## 4.9 Normierung

### 4.9.1 Normierung der Proteinkonzentration

Da die Proteinkonzentrationsbestimmung von Membranproteinen häufig keine exakten Ergebnisse, sondern eher Tendenzen liefert, wird im Anschluss daran eine Normierung mittels SDS-PAGE durchgeführt. Dazu werden alle zu normierenden Proben auf ein oder mehrere SDS-Gele aufgetragen, jeweils 10 µg Protein, basierend auf den Ergebnissen der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Kapitel 4.2). Im Anschluss wird die optische Dichte aller Spuren der Proben wie in Kapitel 4.8.1 beschrieben, berechnet. Nun können alle Proben auf eine Referenzprobe – in dieser Arbeit ist dies die Spur der Probe YAL1 – normiert werden. Der Faktor  $F_x$ , mit der die aus der Proteinbestimmung erhaltene Proteinkonzentration der Probe multipliziert werden muss, ergibt sich aus dem Quotient der optischen Dichte der Spuren für die Referenz-Probe ( $OD_R$ ) und die daran anzupassende Probe ( $OD_x$ ).

$$F_x = \frac{OD_R}{OD_x}$$

### 4.9.2 Normierung der 2D-Gele

#### 4.9.2.1 Normierung über die Markerbanden

Diese Methode der Normierung von 2D-Gelen über die Markerbanden wurde von mir bereits in meiner Diplomarbeit<sup>[92]</sup> beschrieben und kann dort nachgelesen werden.

In dieser Arbeit erfolgte die Normierung der gepoolten Rattenleberproben mittels dieser Methode. Da diese allerdings über extern hinzugegebene Proteine in Form des Markers erfolgt, werden mit dieser Methode keine eventuellen Abweichungen der Proteinmenge berücksichtigt, die schon in der ersten Dimension auftreten. Eine Normierung der Gele über die Markerbanden kann ausschließlich die Färbintensitäten der zu normierenden 2D-Gele

---

ausgleichen, da der Marker erst vor der SDS-Gelelektrophorese der 2. Dimension auf das Gel aufgetragen wird. Daher wurde diese Normierungsmethode für alle folgenden Proben (Rattenhirn und -herz) weiterentwickelt und nicht mehr als alleinige Normierung herangezogen.

#### 4.9.2.2 Normierung über die Proteinmenge der Solubilisate

Diese Methode der Normierung von 2D-Gelen über die Proteinmenge der Solubilisate auf SDS-Gelen wurde bereits in der Diplomarbeit (2010) von Söhn<sup>[91]</sup> beschrieben und kann dort nachgelesen werden.

In dieser Arbeit erfolgte die Normierung der Rattenhirnproben, die von Michaela Söhn während ihrer Diplomarbeit unter meiner Anleitung bearbeitet wurden, mithilfe dieser Methode.

#### 4.9.2.3 Normierung über die Gesamtsumme aller Proteinspots

Für die Normierung über die Gesamtsumme aller auf dem 2D-Gel befindlichen Proteinspots ohne Berücksichtigung der Markerbanden werden für jedes 2D-Gel des Projektes die Absolutwerte (Volume) für einen oder mehrere Proteinspots und die dazugehörigen prozentualen Anteile (% Volume) an der Gesamtintensität des Gels benötigt. Diese erhält man aus der 'Quantitation Table' des Programms Delta2D unter dem Karteireiter 'All Gel Images'. Werden mehrere Spots ausgewählt, werden die daraus resultierenden Gesamtintensitäten in Grauwerten für dasselbe Gel gemittelt.

Ist für jedes 2D-Gel des Projektes die Gesamtintensität ( $I$ ) ermittelt, wird der Mittelwert aller Gesamtintensitäten ( $I_{\text{Durchschnitt}}$ ) berechnet.

$$I_{\text{Durchschnitt}} = \frac{\sum_{x=1}^n I_x}{n}$$

Im Anschluss wird für jedes Gel der Faktor ( $F_x$ ) bestimmt, mit dem jeder Proteinspot des Gels multipliziert werden muss, um die durchschnittliche Gesamtintensität ( $I_{\text{Durchschnitt}}$ ) zu erhalten.

$$F_x = \frac{I_{\text{Durchschnitt}}}{I_x}$$

---

### 4.9.3 Normierung der Aktivitätstests

Die Auswertung der Proteinbanden von *In-Gel*-Aktivitätstests mittels Delta2D liefert Grauwerte für die individuellen Komplexe und die individuellen Komplex enthaltenden Superkomplexe, jedoch kann ausschließlich die spezifische Aktivität ( $A_{spez}$ ) der Komplexe, sowohl individuell als auch in Superkomplexen, als Maß für Aktivitätsvergleiche herangezogen werden. Daher muss der Zuwachs an Präzipitat, das die Aktivität anzeigt, auf die Proteinmenge bezogen werden. Dies erfolgt durch eine Quantifizierung der ausgewählten Proteinbanden direkt nach dem Gellauf zum Zeitpunkt  $t_0$  und für jeden weiteren Zeitpunkt  $t_x$ . Die Präzipitatabildung ergibt sich aus der Differenz der Grauwerte der Zeiten  $t_x$  und  $t_0$ . Da die Präzipitatabildung proportional zur Proteinmenge des Komplexes ist, muss diese durch den Grauwert zum Zeitpunkt  $t_0$  geteilt werden, da hier noch kein Präzipitat vorhanden ist und alleine die Proteinmenge in der Bande den Grauwert bestimmt.

$$A_{spez} = \frac{t_x - t_0}{t_0}$$

Beim Ermitteln der spezifischen Aktivität für einen Superkomplex muss ein weiterer Faktor miteinbezogen werden. Da der Superkomplex nur zu einem definierten Anteil  $R$  aus dem zu untersuchenden Komplex besteht, muss dieser Anteil im Nenner mit dem Grauwert zum Zeitpunkt  $t_0$  multipliziert werden. Wird dies nicht gemacht, wird der kompletten Menge des Superkomplexes die Aktivität zugeschrieben, obwohl nur ein Teil davon die tatsächliche Aktivität bedingt.

$$A_{spez} = \frac{t_x - t_0}{t_0 \cdot R}$$

### 4.10 Statistische Auswertung

Bei allen Diagrammen in dieser Arbeit geben die Fehlerbalken die Standardabweichung des Mittelwertes wieder. Dieser wird stets mithilfe der Excel-Funktion 'STABW' errechnet.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Signifikanztest handelt es sich um den Wilcoxon-Rangsummentest. Dieser wird ebenfalls direkt in Excel durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen nicht-parametrischen Test zur Berechnung der Signifikanz von Unterschieden zweier Mittelwerte. Aufgrund der geringen Anzahl an Proben innerhalb einer Gruppe kann

---

keine ausführliche Varianzanalyse durchgeführt werden, sodass der Wilcoxon-Rangsummentest als Stichprobentest hier das Mittel der Wahl ist.

Der Signifikanztest wird in dieser Arbeit ausschließlich bei Proben durchgeführt, bei denen die Individuen einzeln untersucht werden. Bei Vergleichen gepoolter Proben wird darauf verzichtet, da hier nur zwei technische Replikate zur Verfügung stehen und diese Anzahl zu gering für einen Signifikanztest ist.

Die Details zur Durchführung der statischen Auswertung sind in ausführlicher Form in der Dissertation von Schäfer (2011)<sup>[105]</sup> aufgeführt und können dort nachgelesen werden.

---

## 5 Ergebnisse

---

### 5.1 Effekt des Anti-Oxidantien-Cocktails SCAVEGR™

Der Anti-Oxidantien-Cocktail SCAVEGR™ der Firma BrainBits wurde einige Zeit lang in der Arbeitsgruppe standardmäßig bei der Isolierung von Mitochondrien aus Gewebeproben und bei der Solubilisierung von mitochondrialen Membranproteinen eingesetzt. Der Cocktail soll oxidative Modifikationen verhindern, die durch oxidativen Stress während der Mitochondrienisolierung entstehen. Dies ist daher sinnvoll, da Proben teilweise auf oxidative Modifikationen hin untersucht werden und nachträglich entstandene Modifikationen durch eine Gewebepräparation nicht von in vivo vorliegenden Modifikationen zu unterscheiden sind und daher die Ergebnisse verfälschen würden.

SCAVEGR™ enthält sechs verschiedene Anti-Oxidantien, deren exakte Zusammensetzung in Tabelle 5.1 aufgeführt ist. Hierbei ist besonders auffällig, dass im Vergleich zu den anderen beinhalteten Substanzen die BSA-Konzentration um das 200- bis 1000-fache höher ist. Inwiefern speziell dieser Umstand den Einsatzbereich des Additivs SCAVEGR™ insbesondere bei der Solubilisierung von Membranproteinen einschränkt, wird im Folgenden erläutert.

**Tab. 5.1:** Zusammensetzung von SCAVEGR™ laut Hersteller BrainBits, Stand 2010.

SCAVEGR™	
1 mg/mL	BSA
5 µg/mL	Katalase
2,5 µg/mL	Superoxid-Dismutase
1 µg/mL	Vitamin E
1 µg/mL	Vitamin E Acetat
1 µg/mL	reduziertes Glutathion

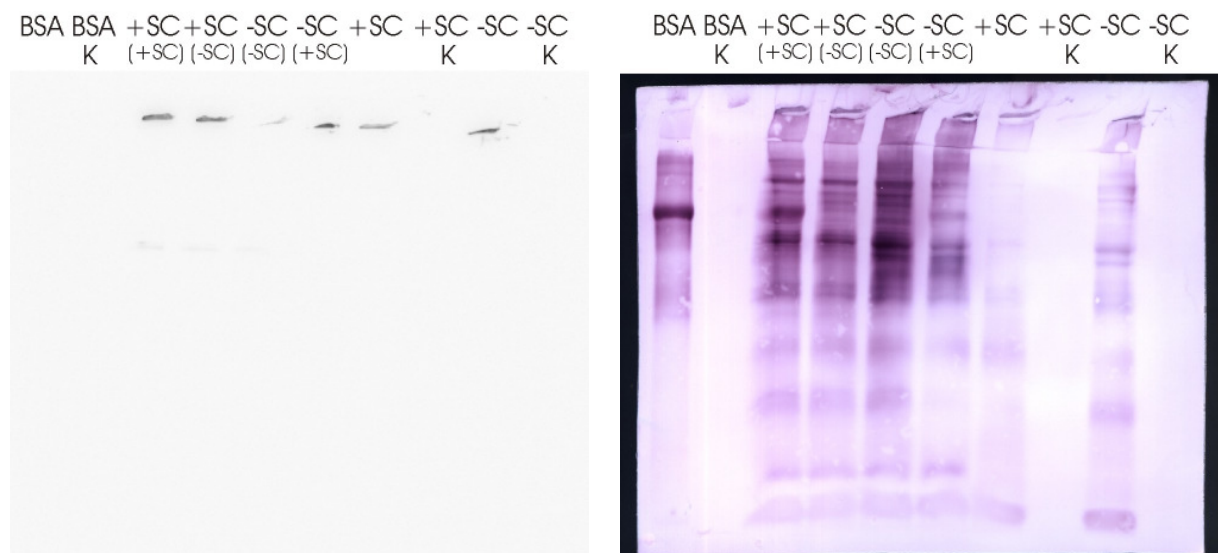
Um den Effekt des Einsatzes von SCAVEGR™ während der Isolierung und Solubilisierung von Mitochondrien zu untersuchen, wurde die Methode des OxyBlotting angewendet. Hierbei handelt es sich um einen Nachweis von Carbonylierungen an Proteinen durch Derivatisierung mit DNPH. Nach SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blotting können die Derivate und damit die Carbonylierungen als Maß für den oxidativen Stress während Isolierung und Solubilisierung von Mitochondrien detektiert werden.

Die nachfolgend dargestellten Untersuchungen wurden an Rinderherzmitochondrien durchgeführt. Dazu wurden aus zwei je ca. 2 g großen Stücken Rinderherzgewebe, das bei -80 °C gelagert wurde, die Mitochondrien wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben isoliert. Dabei

wurde bei einer Probe in allen Schritten SCAVEGR™ in einer Konzentration von 2% (v/v) dem Puffer zugesetzt, während bei der anderen Rinderherzprobe auf den Einsatz des Anti-Oxidantien-Cocktails komplett verzichtet wurde.

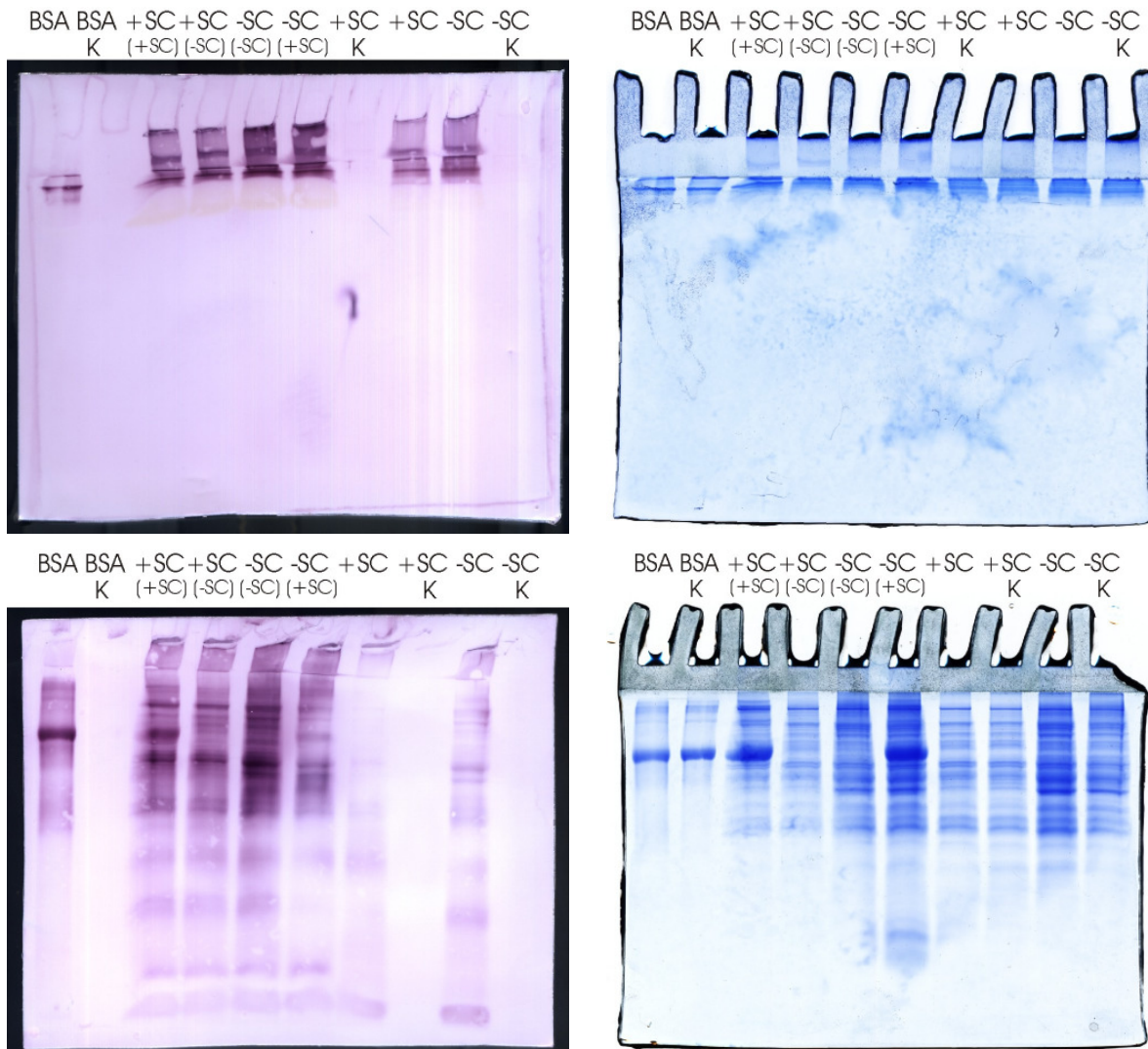
Das verwendete Kit für das Oxyblotting enthält neben Lösungen für den Derivatisierungsprozess auch den Erstantikörper gegen DNP und einen HRP-konjugierten Zweitantikörper. Bei allen durchgeführten Blots wurden die PVDF-Membranen nach Detektion mit Luminol gestrippt und erneut mit dem Erstantikörper des Kits behandelt, um eine Detektion mit Alkalischer Phosphatase durchzuführen. Als Zweitantikörper wurde ein Antikörper verwendet, der nicht im Kit enthalten war. Dabei handelt es sich um einen AP-konjugierten anti-rabbit Zweitantikörper mit einer Verdünnung von 1:2000.

Bei allen durchgeführten Blots zeigten sich bei der Detektion mit Luminol signifikant weniger Banden als bei der Detektion mit Alkalischer Phosphatase. Ein Beispielblot ist in Abbildung 5.1 gezeigt. Bei früheren Oxyblots in der Arbeitsgruppe, die mit den gleichen Reagenzien hergestellt und bei denen die Proteine auf die gleiche Weise detektiert wurden, konnte kein solch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die einzige Änderung der bisherigen Blots und den hier gezeigten Blots besteht in einer der Derivatisierung vorangegangenen Solubilisierung der mitochondrialen Proteine. Es wäre möglich, dass das durch die Solubilisierung in die Probe eingebrachte Digitonin die Detektion mit Luminol spezifisch stört.



**Abb. 5.1:** OxyBlot von solubilisierten und nicht-solubilisierten Rinderherzproben, detektiert mit Luminol (links) und anschließend mit Alkalischer Phosphatase (rechts). +SC und -SC zeigen an, ob der Anti-Oxidantien-Cocktail SCAVEGR™ bei der Isolierung der Mitochondrien eingesetzt wurde. Die Proben in den Spuren, die zusätzlich mit (+SC) und (-SC) beschriftet sind, wurden zuvor solubilisiert, jeweils mit (2% (v/v)) bzw. ohne SCAVEGR™. Die Kontrollspuren, die mit K gekennzeichnet sind, wurden mit einer Kontrolllösung derivatisiert und sollten auf dem Blot keine Banden zeigen. Es ist deutlich zu sehen, dass die Detektion mit Luminol im Vergleich mit Alkalischer Phosphatase unzureichend ist.





**Abb. 5.2:** OxyBlots (links), detektiert mit Alkalischer Phosphatase, und die dazugehörigen SDS-Gele (rechts), nach dem Blotten gefärbt mit Roti<sup>®</sup>-Blue. Aufgetragen sind solubilisierete (Detergens zu Protein Verhältnis: 3 g/g) und nicht-solubilisierete Rinderherzmitochondrien, jeweils 20 µg Protein. Nach der Solubilisierung wurden nicht-solubilisierete Bestandteile nicht abzentrifugiert, um die komplette Proteinmenge auch bei den solubilisierten Proben auftragen zu können. +SC und -SC zeigen an, ob der Anti-Oxidantien-Cocktail SCAVEGR<sup>™</sup> bei der Isolierung der Mitochondrien eingesetzt wurde. Die Proben in den Spuren, die zusätzlich mit (+SC) und (-SC) beschriftet sind, wurden zuvor solubilisiert, jeweils in Gegenwart von 2% (v/v) SCAVEGR<sup>™</sup> bzw. in Abwesenheit von SCAVEGR<sup>™</sup>. Die Kontrollspuren sind mit K gekennzeichnet. Bei beiden Blots ist zu erkennen, dass alle Spuren der solubilisierten Proben deutlich mehr Modifikationen aufweisen als die unsolubilisierten Proben, was darauf schließen lässt, dass die Proteine während der Solubilisierung mindestens genauso anfällig sind für oxidative Modifikationen, in diesem Fall Carbonylierungen, wie bei der Isolierung der Mitochondrien. Weiterhin ist zu erkennen, dass in den Spuren mit der Probe -SC trotz mehrfacher Proteinkonzentrationsbestimmung eine größere Proteinmenge vorhanden ist als in den Spuren mit der Probe +SC, was vermutlich der Grund dafür ist, dass diese eine größere Menge an Carbonylierungen zeigt. Weiterhin ist in den Spuren der beiden Proben, die während der Solubilisierung mit SCAVEGR<sup>™</sup> versetzt wurden, die sehr ausgeprägte BSA-Bande zu sehen, weshalb auf den Einsatz des Anti-Oxidantien-Cocktails bei Solubilisierungen verzichtet werden sollte.



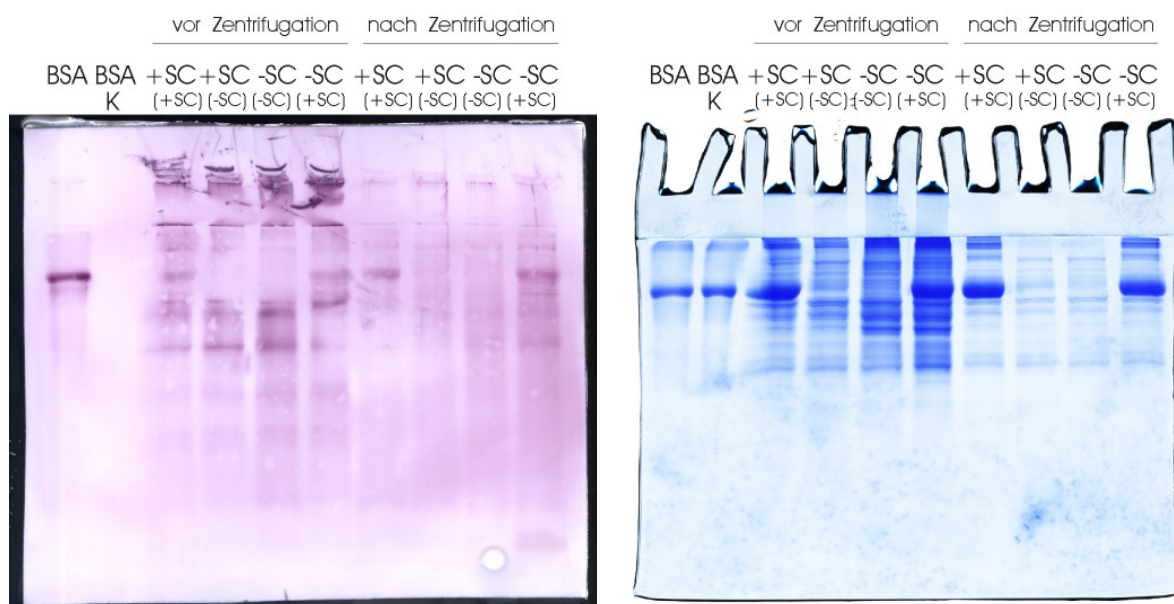
---

In Abbildung 5.1 erkennt man auf dem mit Luminol detektierten Blot fast ausschließlich die Banden, die den Boden der Tasche und damit das nicht eingelaufene Protein darstellen. In der Spur mit derivatisiertem BSA ist sogar keine einzige Bande detektiert worden, weder das Protein am Taschenboden, noch die spezifische BSA-Bande. Eine längere Belichtung des Blots führte zu keiner Verbesserung, ausschließlich der Hintergrund färbte sich dunkler.

Das Bandenprofil desselben Blots, das mit Alkalischer Phosphatase detektiert wurde, zeigt sich deutlich vielfältiger. Abbildung 5.2 zeigt ebenfalls diesen Blot mit dem dazugehörigen mit Roti®-Blue gefärbten SDS-Gel nach dem Blottingvorgang. Das Bandenmuster des Blots entspricht etwa demjenigen des SDS-Gels, was darauf schließen lässt, dass es sich bei den Schwierigkeiten bei der Detektion mit Luminol weder um ein Problem des Proteintransfers oder der Blottingeffizienz handelt, noch um ein Problem des Erstantikörpers, da dieser bei beiden Detektionsvarianten verwendet wird. Der verwendete HRP-konjugierte Kit-Antikörper könnte eventuell zu ineffizient sein, allerdings spricht das Ausbleiben des hier beobachteten Problems bei der bisherigen Verwendung des Kits dagegen. Die wahrscheinlichste Ursache für die schlechte Detektion mit Luminol ist demnach das Digitonin, das auf bisher unbekannte Weise die Chemilumineszenzreaktion zu stören scheint.

Die Untersuchung des anti-oxidativen Effekts von SCAVEGR™ mittels OxyBlotting zeigte, dass nicht nur während der Isolierung der Mitochondrien oxidative Modifikationen wie Carbonylierungen in die Proteine eingebracht werden, sondern auch mindestens im gleichen Ausmaß bei der Solubilisierung der mitochondrialen Proteine. In Abbildung 5.2 ist dies in den beiden Bildern der OxyBlots in der linken Spalte sehr deutlich zu erkennen. Bei beiden Blots wurden sowohl die Rohmitochondrien beider Isolierungsansätze mit SDS versetzt, mit DNPH derivatisiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen, als auch eine in der Arbeitsgruppe übliche Solubilisierung der Proteine mit Digitonin vor der Derivatisierung durchgeführt. Bei den zuvor mit Digitonin solubilisierten Proben wurde auf einen sonst üblichen Zentrifugationsschritt verzichtet, der normalerweise unsolubilisierbare Bestandteile der Probe im Sediment sammelt. Nach üblichen Solubilisierungen mit Digitonin wird ausschließlich der Überstand dieser Zentrifugation auf ein Gel aufgetragen, um zu verhindern, dass große unsolubilisierbare Bestandteile den Übergang in das Polyacrylamid-Gel verstopfen und solubilisierbare Proteine am Eintritt in das Gel gehindert werden. Da im Fall des OxyBlottings die Probe, egal ob sie vorher mit Digitonin solubilisiert oder unbehandelt verwendet wurde, mit 12%iger SDS-Lösung versetzt wird, die auch unsolubilisierbare Bestandteile denaturiert, ist es nicht notwendig, den erwähnten Zentrifugationsschritt durchzuführen. Dadurch wird ebenfalls sichergestellt, dass die komplette Menge an Protein auf das Gel aufgetragen werden kann. In jede Spur mit Rinderherzmitochondrien wurden 20 µg Protein aufgetragen.

Vergleicht man in Abbildung 5.2 die Spuren der derivatisierten Mitochondrien-Rohfraktionen mit den dazugehörigen Spuren der Digitonin-Solubilisate der gleichen Probe, unabhängig davon, ob SCAVEGR™ bei der Solubilisierung zugesetzt wurde, erkennt man anhand der dunkleren Violett-Färbung der Spuren, dass die solubilisierten Proben deutlich mehr Carbonylierungen aufweisen als die unbehandelten Mitochondrien. Dies ist sowohl bei dem oberen abgebildeten Blot zu sehen, bei dem die Gelelektrophorese nach Einlauf der Proben in das Trenngel gestoppt wurde, um die Gesamtmenge der Carbonylierungen zu visualisieren, als auch beim unteren Blot, bei dem die Proben vollständig aufgetrennt wurden. Das deutet darauf hin, dass die Solubilisierung mindestens genauso harsch bezüglich oxidativem Stress zu sein scheint wie die Isolierung der Mitochondrien aus Gewebe.



**Abb. 5.3:** OxyBlot (links), detektiert mit Alkalischer Phosphatase, und das dazugehörige SDS-Gel (rechts), nach dem Blotten gefärbt mit Roti®-Blue. Aufgetragen sind solubilierte (Detergens zu Protein Verhältnis: 3 g/g) Rinderherzmitochondrien, jeweils 20 µg Protein pro Spur. Nach der Solubilisierung wurden bei einem Satz Proben nicht-solubilierte Bestandteile nicht abzentrifugiert, um die komplette Proteinmenge auftragen zu können. Beim zweiten Satz wurde eine Zentrifugation durchgeführt und nur der Überstand aufgetragen. +SC und -SC zeigen an, ob der Anti-Oxidantien-Cocktail SCAVEGR™ bei der Isolierung der Mitochondrien eingesetzt wurde. Die Proben in den Spuren, die zusätzlich mit (+SC) und (-SC) beschriftet sind, wurden zuvor solubiliert, jeweils mit (2% (v/v)) bzw. ohne SCAVEGR™. Die Kontrollspur ist mit K gekennzeichnet. Es ist ziemlich deutlich zu erkennen, dass durch die Zentrifugation nach der Solubilisierung generell viel Protein im Sediment verbleibt. Betrachtet man den Bereich der Probenspuren unterhalb der Höhe der BSA-Bande sowohl im Blot als auch auf dem Gel, fällt auf, dass sich die Proteine derjenigen Banden, die die höchste Anzahl an Carbonylierungen aufweisen, offenbar zum größten Teil im Sediment der solubilierten Probe verbleiben.

---

Bei den beiden Spuren der mit SCAVEGR™ solubilisierten Proben des unteren Blots und vor allem in dem dazugehörigen SDS-Gel in Abbildung 5.2 erkennt man deutlich die sehr ausgeprägten BSA-Banden, die durch Zusatz des BSA-haltigen Anti-Oxidantien-Cocktails zum Solubilisierungspuffer entstanden sind. Obwohl SCAVEGR™ nur mit einem Anteil von 2% (v/v) im Solubilisierungspuffer enthalten ist, sind die Banden des BSA die prägnantesten in der ganzen Spur. Als Referenz und Kontrolle wurden BSA-Lösungen mit einer Konzentration von 10 mg/ml der gleichen OxyBlot-Prozedur unterzogen und 5 µg Protein auf das Gel aufgetragen. Die BSA-Bande in den Solubilisaten wirkt mindestens ebenso ausgeprägt wie in der Referenz- bzw. Kontrollspur. Dieser Effekt ist ebenfalls in Abbildung 5.3 zu sehen. Hier wurden mit Digitonin solubilierte Rinderherzmitochondrien aufgetragen, jeweils ohne und mit abschließenden Zentrifugationsschritt. Wurde zentrifugiert, wurde der Überstand abgenommen und in einem neuen Eppendorf-Gefäß der Derivatisierung unterzogen. In den Proben, die zentrifugiert wurden, ist die BSA-Bande im Vergleich zur restlichen Spur extrem stark. Lädt man das Solubilisat, bei dem SCAVEGR während der Solubilisierung dem Puffer zugesetzt war, auf ein BN-Gel, erhält man auch hier überdimensional dicke BSA-Banden, wie in Abbildung 5.4 sehr gut zu sehen ist. Auch hier ist die Bande um ein Vielfaches stärker ausgeprägt als im zusätzlich aufgetragenen HMW-Protein-Standard, der ebenfalls BSA enthält. Des Weiteren fällt hier auf, dass in den entsprechenden Spuren in den Bereichen unterhalb des ATP-Synthase-Monomers eine deutlichere Blaufärbung als in den vergleichbaren Spuren ohne SCAVEGR™ im Solubilisierungspuffer eine erhöhte Proteinmenge indiziert. Diese Beobachtungen sowohl in SDS-Gelen als auch in BN-Gelen zeigen, dass SCAVEGR™ aufgrund des hohen Anteils an BSA und weiteren Proteinen nicht während der Solubilisierung eingesetzt werden sollte, da die extrem ausgeprägte BSA-Bande andere Banden mitochondrialer Proteine von Interesse überdecken kann. Zusätzlich verfälschen andere in SCAVEGR™ enthaltene Proteine wie Katalase oder Superoxid-Dismutase die Quantifizierung dieser mitochondrialen Proteine in 2D-Gelen oder Western Blots.

Die Fragestellung nach der Notwendigkeit des Einsatzes von SCAVEGR™ bei der Isolierung der Mitochondrien aus Gewebeproben stellt sich etwas differenzierter dar. Die OxyBlots in den Abbildungen 5.2 und 5.3 zeigen in den Spuren der mit SCAVEGR™ isolierten Rinderherzmitochondrien tatsächlich eine geringere Menge an Carbonylierungen. Jedoch zeigt ein Blick auf die dazugehörigen SDS-Gele, dass in den Spuren der mit SCAVEGR™ isolierten Mitochondrien generell weniger Protein vorhanden ist. Vermutlich wurde aufgrund einer ungenauen Proteinbestimmung weniger Protein als die berechneten 20 µg aufgetragen. Dieser Umstand lässt darauf schließen, dass der scheinbare anti-oxidative Effekt von

---

SCAVEGR™ hinsichtlich Carbonylierungen wohl eher auf die unterschiedlichen Proteinmengen zurückzuführen ist.

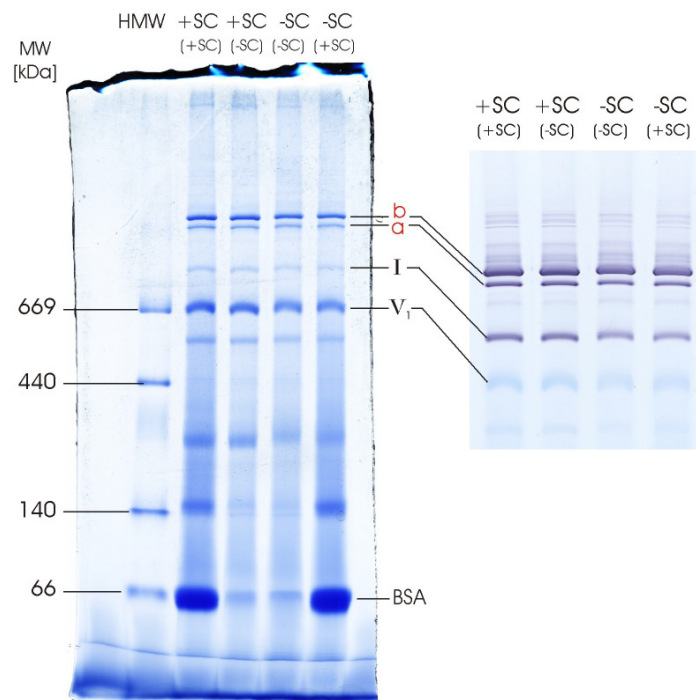
Der Einsatz von SCAVEGR™ während der Isolierung von Mitochondrien kann zu ähnlichen Problemen, allerdings in geringerem Ausmaß, wie bei der Solubilisierung führen. Dadurch, dass eine nicht unerhebliche Menge Protein während der Prozedur zugesetzt wird, kann dies einige Ergebnisse verfälschen. Durch den Verzicht auf SCAVEGR™ im Lagerpuffer und die Sedimentation der Mitochondrien am Schluss der Prozedur wird ein Großteil der künstlich zugesetzten Proteine zwar wieder aus der Probe entfernt, allerdings ist nicht auszuschließen, dass ein gewisser Anteil beispielsweise durch Anlagerung an die Mitochondrien in der Probe verbleibt. Da die Menge nicht proportional zur Menge der mitochondrialen Proteine ist und damit von Probe zu Probe variiert, kann es zu Fehlbestimmungen der Proteinmenge führen. Da eine exakte Proteinbestimmung aber essentiell für den Proteomik-Ansatz mittels 2D-BN/SDS-Gelelektrophorese ist, bei der das Detergenszu-Protein-Verhältnis nicht von Probe zu Probe variieren darf, sollte auf die Verwendung von SCAVEGR™ vorsichtshalber verzichtet werden. Dies sollte in jedem Fall geschehen, falls die Maschinerie der Abwehr von ROS untersucht und durch 2D-Gelelektrophorese oder Western Blotting quantifiziert werden soll, da sowohl Katalase als auch Superoxid-Dismutase, die beide *in vivo* in Mitochondrien vorkommen, durch Zusatz von SCAVEGR™ künstlich in die Probe eingebracht werden.

Abbildung 5.4 zeigt ein mit Roti®-Blue gefärbtes BN-Gel und einen *In-Gel*-Aktivitätstest für Komplex I. Hier zeigt sich kein Aktivitätsunterschied, unabhängig davon, ob SCAVEGR™ während der Isolierung, Solubilisierung oder beidem eingesetzt wurde. Die Firma selbst wirbt mit einem Artikel von Brewer et al.<sup>[106]</sup> aus dem Jahr 2004, in dem gezeigt wurde, dass die Respirationsrate von Rattenhirn-Mitochondrien, die mithilfe von SCAVEGR™ isoliert wurden, auf das Doppelte ansteigt. Falls dies auch bei Herz-Mitochondrien der Fall sein sollte, ist der Effekt scheinbar nicht auf eine erhöhte Aktivität von Komplex I zurückzuführen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass auf einen Einsatz von SCAVEGR™ bei der Solubilisierung besser verzichtet werden sollte. Wenn Mitochondrien aus Gewebe isoliert werden sollen, muss berücksichtigt werden, welche Untersuchungen gemacht werden sollen. Werden oxidative Modifikationen untersucht, kann SCAVEGR™ eingesetzt werden, um sicherstellen zu können, dass keine bis weniger Modifikationen durch die Isolierung entstehen, auch wenn spezifisch für Carbonylierungen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Werden jedoch Experimente geplant, die eine Quantifizierung der Protein-Gesamtmenge oder einzelner Proteine zugrunde legt, sollte hier vorsichtshalber auf

die Verwendung verzichtet werden, um diese Ergebnisse nicht durch die extern durch den Einsatz von SCAVEGR™ in die Probe eingebrachten Proteine zu verfälschen.

Die Zusammensetzung von SCAVEGR™, vornehmlich die hohe Konzentration an BSA, wurde scheinbar von Anwendern häufiger kritisiert, da BrainBits mittlerweile die Zusammensetzung geändert hat, indem BSA vollständig aus der Mischung entfernt wurde. SCAVEGR™ besteht nun laut Homepage der Firma BrainBits<sup>[107]</sup> nur noch aus den restlichen fünf Bestandteilen (siehe Tab. 5.1), wobei leider keine genaue Zusammensetzung aufgeführt ist.



**Abb. 5.4:** BN-Gel (links), gefärbt mit Roti®-Blue, und *In-Gel*-Aktivitätstest von Komplex I (rechts). Aufgetragen sind solubilisierte Rinderherzmitochondrien (Detergens zu Protein Verhältnis: 3 g/g), jeweils 70 µg Protein pro Spur im gefärbten BN-Gel, 100 µg Protein beim Aktivitätstest. +SC und -SC zeigen an, ob der Anti-Oxidantien-Cocktail SCAVEGR™ bei der Isolierung der Mitochondrien eingesetzt wurde, während (+SC) und (-SC) den Einsatz während der Solubilisierung beschreibt. Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass die BSA-Bande in den Proben, bei denen SCAVEGR™ während der Solubilisierung eingesetzt wurde sehr stark ausgeprägt sind. Unterhalb des ATP-Synthase-Monomers ( $V_1$ ) bis hin zur BSA-Bande zeigen beide Spuren eine deutlichere Färbung als in den Spuren ohne SCAVEGR™, was auf einen damit eingebrachten Proteinschmier schließen lässt. Es ist ebenfalls zu sehen, dass alle Proben eine hohe Aktivität von Komplex I zeigen. Die Rinderherzmitochondrien, die mit SCAVEGR™ isoliert wurden, zeigen generell mehr Protein in den Spuren. Dies ist vermutlich auf eine fehlerhafte Proteinbestimmung zurückzuführen, in der mehr Protein detektiert wurde, als in der Probe vorhanden ist, was zu einem höheren Detergens-zu-Protein-Verhältnis und damit zu einem höheren Anteil solubilisierten Proteins führt. Weder dieser Umstand noch SCAVEGR™ haben einen Einfluss auf die Aktivität. Mittels Quantity One wurde von allen Spuren bis knapp unterhalb von  $V_1$  die Gesamt-OD bestimmt und verglichen. Die beiden Spuren mit BHM ohne SCAVEGR™ isoliert, zeigen nur ca.  $73\% \pm 1\%$  der Proteinmenge im Vergleich zu den Spuren mit BHM, die mit SCAVEGR™ isoliert wurden, sowohl im gefärbten BN-Gel als auch im Aktivitätstest.



## 5.2 Vergleich von Aktivitätstestlösungen für Komplex I

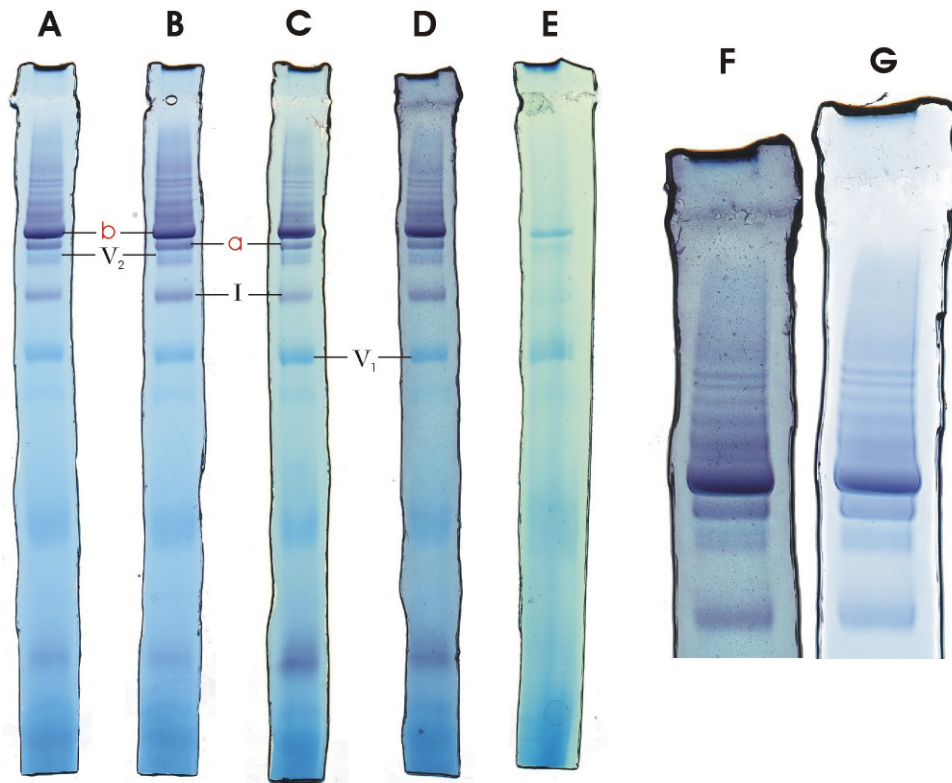
Eine Zeit lang wurden in der Arbeitsgruppe Aktivitätstests für Komplex I nach zwei unterschiedlichen Rezepturen durchgeführt, die in Tabelle 5.2 angegeben sind. Vor dieser Zeit wurde standardmäßig die Rezeptur mit Glycin verwendet. Durch Mitarbeiterwechsel etablierte sich offenbar die zweite Rezeptur ohne Glycin, ohne dass die Redundanz zweier verschiedener Aktivitätstestlösungen bemerkt wurde. Nach Feststellung dieses Zustandes musste demnach festgestellt werden, ob beide Lösungen gleichermaßen funktionieren und ob es Vor- oder Nachteile bei Verwendung einer der beiden Lösungen gibt.

**Tab. 5.2:** Getestete Aktivitätstestlösungen mit und ohne Glycin.

Aktivitätstestlösung mit Glycin		Aktivitätstestlösung ohne Glycin	
100 mM	Tris / HCl pH 7,4	5 mM	Tris / HCl pH 7,4
768 mM	Glycin	3 mM	NBT
0,489 mM	NBT	0,14 mM	NADH, reduziert
0,1 mM	NADH, reduziert	in MilliQ	
in MilliQ			

Für den Test wurden beide Lösungen jeweils sowohl wenige Tage vorher zubereitet und anschließend bei -20°C eingefroren als auch frisch kurz vor Benutzung hergestellt. Die eingefrorenen Lösungen wurden 3 Stunden vor Benutzung aus dem Gefrierschrank entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Mit 3 g/g solubilisierter Rinderherzmitochondrien wurden in einer BN-Gelelektrophorese aufgetrennt, pro Spur 70 µg Protein vor Solubilisierung. Die aus den Spuren resultierenden Gelstreifen wurden zeitlich um 5 min versetzt in den jeweiligen Lösungen für 40 min inkubiert.

Farblich zeigten die Lösungen des frischen und aufgetauten Puffers mit Glycin und des frischen Puffers ohne Glycin keine Unterschiede. Nach dem Auftauen des Puffers ohne Glycin zeigte sich die Lösung leicht violett gefärbt, da es offenbar zu einer Präzipitatbildung durch den Einfriervorgang gekommen war. Diese Beobachtungen spiegeln sich ebenfalls in den Streifen wider, die mit den jeweiligen Lösungen inkubiert wurden. Während in Abb. 5.5 die Streifen A bis C (inkubiert in frischem und aufgetautem Puffer mit Glycin und frischem Puffer ohne Glycin) keine sichtbaren Unterschiede feststellbar sind, erkennt man bei Streifen D eine etwas dunklere Färbung des Hintergrunds. Zusätzlich dazu haben sich an den Rändern und vornehmlich im Bereich des BN-Gels mit einer niedrigen Totalacrylamidkonzentration des Streifens violette Ablagerungen gebildet, die in der Vergrößerung (F) des Streifens deutlicher erkennbar ist. Diese Ablagerungen können durch Entfärben von mindestens 12 Stunden mit dest. VE-Wasser wieder entfernt werden (G). Je länger allerdings die Inkubation in Testpuffer dauert, desto schwieriger wird die vollständige Entfernung.



**Abb. 5.5:** BN-Gel-Streifen, die in verschiedenen *In-Gel*-Aktivitätstestlösungen für Komplex I 40 min lang inkubiert wurden. Jeder Streifen enthält 70 µg BHM, solubilisiert mit einem Digitonin-zu-Protein-Verhältnis von 3 g/g. Getestet wurden die in Tabelle 5.2 angegebenen Lösungen. Streifen A und B wurden in Puffer mit Glycin inkubiert, sowohl frisch zubereitet (A) als auch bei -20°C gelagert und aufgetaut (B), C und D in Testpuffer ohne Glycin, ebenfalls frisch (C) und aufgetaut (D). Bei der Lösung von Streifen E handelt es sich um den Puffer ohne Glycin, der bereits wenige Tage vor dem Test aufgetaut und einmal verwendet wurde. Da nach dem Auftauen scheinbar violette Formazan in der Lösung ausgefallen ist, wurde dieses abfiltriert. Bis zur Verwendung wurde der Puffer bei Zimmertemperatur aufbewahrt und kurz vorher wieder mit der ursprünglichen Menge NBT versetzt. F ist eine Vergrößerung von Streifen D, G ist ebenfalls derselbe Streifen, allerdings nach dem Fixieren 24 Stunden in dest. VE-Wasser entfärbt. Es sind nur wenige Unterschiede des Resultats der beiden Aktivitätstestpuffer zu sehen. Streifen E zeigt überhaupt keine Aktivität, obwohl zuvor das violette Präzipitat aus dem aufgetauten Puffer gefiltert wurde und mit frischem NBT versetzt wurde. Streifen D zeigt violette Ablagerungen auf dem Gel, vornehmlich am oberen Ende des Streifens im Bereich der niedrigen Totalacrylamidkonzentration. Dies ist noch deutlicher in der Vergrößerung (F) zu sehen. Durch das Entfärben wurden diese Ablagerungen allerdings fast vollständig aufgelöst (G).

Die violetten Präzipitate in der eigentlich gelben Testlösung ohne Glycin wurden vor dem Test der beiden Lösungen bereits beobachtet. Eine aufgetaute Lösung, mit der wenige Tage zuvor ein Aktivitätstest durchgeführt wurde, zeigte ebenfalls eine durch die Präzipitate leichte Violett-Färbung. Diese Lösung wurde ebenfalls getestet, allerdings wurde die Lösung filtriert und bei Zimmertemperatur gelagert. Direkt vor dem Test wurde sie erneut mit NBT versetzt und der Gelstreifen darin inkubiert. Nach 40 min wurde auch dieser Test gestoppt, bei dem sich keine Aktivität zeigte. Da die solubilisierten Rinderherzmitochondrien in allen getesteten Streifen aus dem gleichen Ansatz stammen, ist nicht davon auszugehen, dass diese für das

---

Ergebnis verantwortlich ist. Ebenfalls kann NBT kein Grund für das Ausbleiben einer Färbung sein, da dieses in der erforderlichen Menge vor dem Test frisch zugesetzt wurde. Diese Umstände lassen darauf schließen, dass es sich offenbar um ein Problem des reduzierten NADH handelt. Möglicherweise führt die Lagerung bei Zimmertemperatur zu einem Zerfall oder zur Oxidation des NADH, sodass die Redox-Reaktion nicht mehr ablaufen kann. Das reduzierte NADH scheint generell nicht sehr stabil zu sein, denn nach Lagerung in wässriger Lösung bei -20°C läuft die Präzipitatbildung im Test deutlich langsamer ab, als wenn es frisch als Pulver zu der Lösung hinzugefügt wird. Die hier gezeigten Tests enthielten alle eingefrorenes NADH, auch die Tests, die frisch angesetzt wurden. Hier wurde ein eingefrorenes Aliquot einer NADH-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL verwendet. Im Vergleich zu ebenfalls frisch angesetzten Lösungen, die allerdings mit Pulver statt einer gefrorenen Stammlösung hergestellt werden, zeigen Rinderherzmitochondrien nach etwa der Hälfte der Zeit eine ähnliche Intensität der Präzipitatbildung (Daten nicht gezeigt). Wird eine Testlösung verwendet, die eingefroren war, kann vorher eine Spatelspitze NADH-Pulver hinzugefügt und darin gelöst werden, um den Test in einer vergleichbaren Zeit zu komplett frisch angesetzter Lösung durchführen zu können.

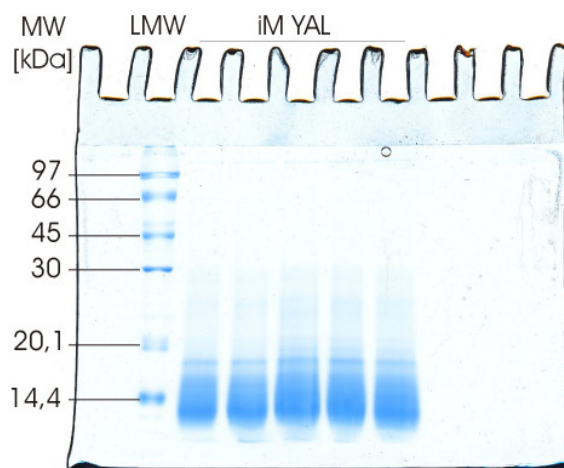
Zusammenfassend kann man sagen, dass keine Unterschiede in der Intensität oder der Zeit zwischen den beiden Aktivitätstestlösungen festgestellt wurden, sofern sie vor dem Test frisch angefertigt wurden. Bei den eingefrorenen Tests zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied. Die Testlösung ohne Glycin zeigte durch das Einfrieren bereits violette Präzipitate nach dem Auftauen. Werden diese nicht abfiltriert, lagern sie sich während der Inkubation des Gelstreifens sowohl an den Rändern als auch auf der Oberfläche des Streifens ab. Dies ist zwar reversibel durch anschließendes Fixieren in Fixierlösung und Entfärben in dest. VE-Wasser, allerdings steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Ablagerungen nicht wieder komplett entfernt werden können, mit der Dauer der Inkubation. Angesichts der Tatsache, dass sich der Test ohne Glycin nicht gut einfrieren lässt und die größere benötigte Menge an teuren Substraten wie NBT und reduziertem NADH eingesetzt werden müssen, erscheint die Testlösung mit Glycin als die sinnvollere Variante. Hier kann die Lösung ohne Bedenken eingefroren werden. Gibt man direkt vor dem Gebrauch eine Spatelspitze reduziertes NADH in Pulverform hinzu und löst dieses in der aufgetauten Lösung, hat man eine Aktivitätstestlösung, die ebenso gut und schnell funktioniert wie eine frisch angesetzte Lösung.



### 5.3 Effekt von Nagarse und deren Inhibitoren bei der Gelelektrophorese

Nagarse ist eine bakterielle Serin-Protease, die häufig bei der Isolierung von Mitochondrien aus Muskelgewebe eingesetzt wurde. Diese ermöglichte durch Verdau der Muskelfibrillen, dass eine zweite Mitochondrienspezies aus Muskelgewebe isoliert werden konnte, die nur bei herkömmlicher Isolierung durch Homogenisierung des Gewebes verworfen worden wäre<sup>[76]</sup>. Da sich diese so genannten interfibrillären Mitochondrien zwischen den sehr festen und gegen mechanische Kräfte sehr resistenten Fibrillen befinden, kann nur ein partieller Verdau mit anschließender Homogenisierung die dort eingeschlossenen Mitochondrien freilegen.

Das Enzym ist heutzutage leider nicht mehr kommerziell erhältlich und so kam in dieser Arbeit eine alternative, jedoch in ihrer Funktionsweise analoge bakterielle Serin-Protease von Sigma (Proteinase, bacterial Type XXIV, P8038) zum Einsatz<sup>[108]</sup>. Das Enzym wurde wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben ausschließlich bei der Isolierung der interfibrillären Mitochondrien aus Rattenherz verwendet.



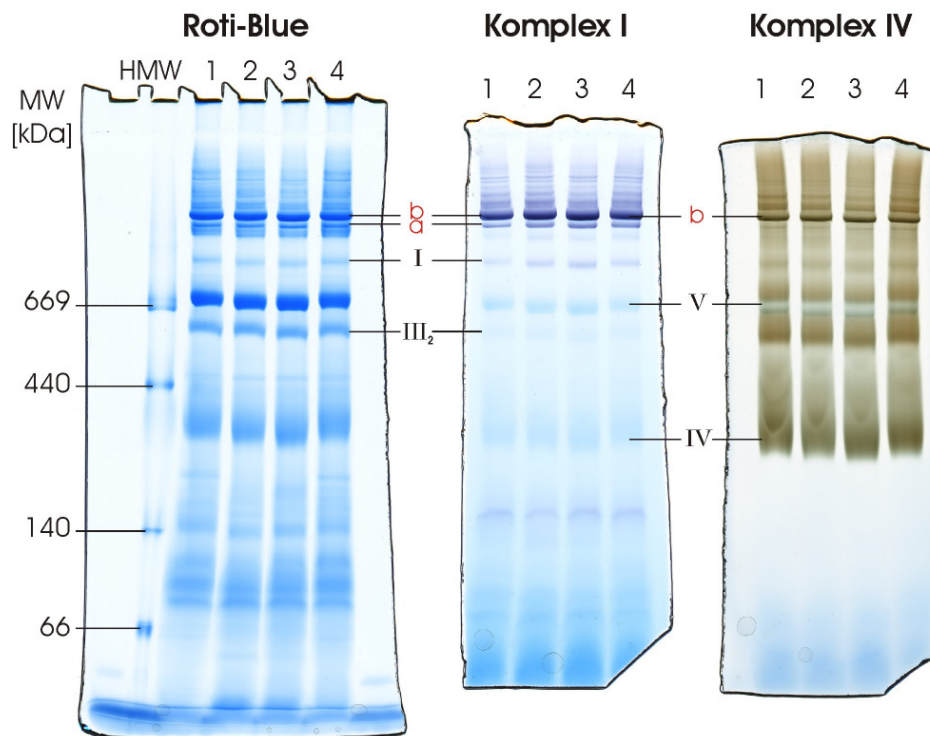
**Abb. 5.6:** SDS-Gel mit je 10 µg Protein vor Solubilisierung der interfibrillären Rattenherzmitochondrien (iM) aller fünf Individuen der YAL-Gruppe (jung, *ad libitum* gefüttert). Die interfibrillären Mitochondrien wurden durch Zugabe einer bakteriellen Protease, ähnlich des Enzyms Nagarse, isoliert. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich in der SDS-Gelelektrophorese kein übliches Bandenmuster von mitochondrialen Proteinen zeigt. Vielmehr fällt auf, dass sich im Bereich über 30 kDa nur eine einzige sehr schwache Bande erkennen lässt, während im unteren Bereich bis etwa 20 kDa ein sehr ausgeprägter Proteinschmier gebildet hat ohne distinkte Banden. Dies lässt darauf schließen, dass die bei der Isolierung der interfibrillären Mitochondrien zugesetzte bakterielle Protease nicht komplett durch die ebenfalls während der Isolierung durchgeführten Zentrifugationsschritte aus der Probe entfernt werden kann. Überraschenderweise zeigt das Enzym selbst nach SDS-Behandlung Aktivität, was dazu führt, dass die mitochondrialen Proteine im SDS-Gel durch die Protease degradiert wurden.

---

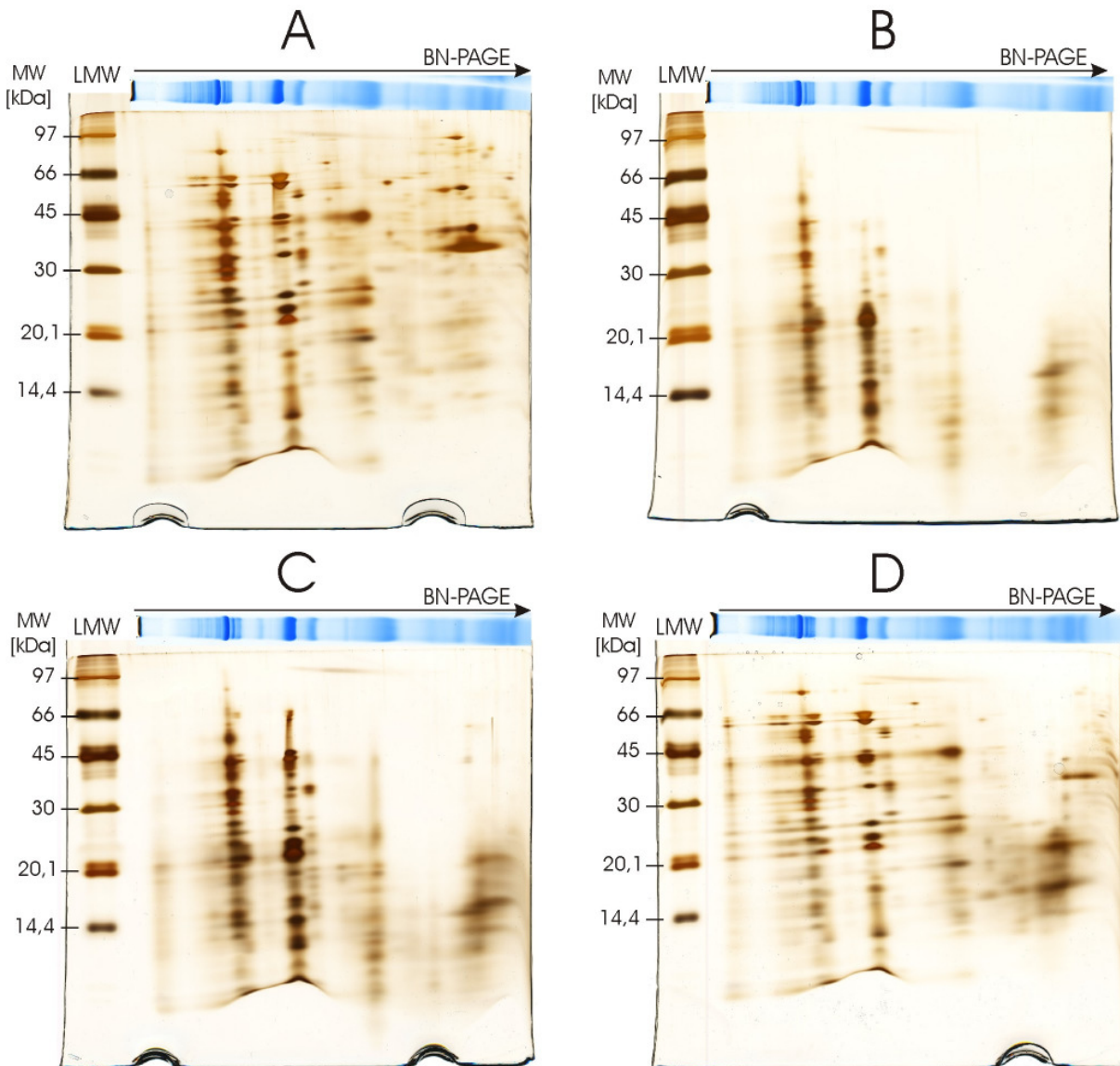
Bei den initialen Experimenten mit den interfibrillären Mitochondrien zeigte sich vor allem bei der SDS-Gelelektrophorese ein unerwartetes Bild. Wie Abbildung 5.6 zeigt, sind bei einer herkömmlichen SDS-PAGE in allen Spuren keine Banden oberhalb von 30 kDa vorhanden. Jegliches auf das Gel aufgetragene Protein scheint sich nur in der unteren Hälfte des Gels zu befinden, ohne Ausbildung distinkter Banden. Weitere SDS-Gelelektrophoresen anderer, zu Testzwecken verwendeten und ebenfalls mit der Nagarse-ähnlichen Protease behandelten Rattenherzproben zeigten das gleiche Muster (Daten nicht gezeigt). Eine Literaturrecherche brachte einen Artikel von Wilson<sup>[109]</sup> (1987) hervor, in dem die Vor- und Nachteile des Einsatzes von Nagarse während der Isolierung von Hirnmitochondrien diskutiert werden. In diesem Artikel wurde gezeigt, dass das Enzym scheinbar teilweise an den Mitochondrien haften bleibt und sich somit trotz diverser Zentrifugationsschritte während der Isolierung nach wie vor in der Probensuspension vorhanden ist. Ebenso wurde herausgefunden, dass das Enzym durch Zugabe von SDS nicht denaturiert wird, sondern sogar aktiviert wird. Erst durch Zugabe von Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) konnte die Aktivität des Enzyms in der Probe während der Gelelektrophorese fast vollständig inhibiert werden<sup>[109]</sup>.

Um zu testen, ob PMSF ebenso die Nagarse-ähnliche Protease inhibiert, die bei der Isolierung der hier untersuchten Rattenherzproben zum Einsatz kam, wurden Rinderherzmitochondrien vor den durchgeführten Gelelektrophoresen mit dem Enzym versetzt (1 µg Enzym pro 100 µg Protein). Zu diesen Proben wurden sowohl PMSF als auch der strukturell sehr ähnliche Serin-Protease-Inhibitor 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF), bekannt unter dem Handelsnamen Pefabloc SC, hinzugefügt und einer 2D-BN-SDS-Gelelektrophorese unterzogen. Da die mit der Serin-Protease isolierten Mitochondrien aus Rattenherz ebenfalls mittels dieser Methodik untersucht werden, ist eine erfolgreiche Inhibition des Enzyms während der BN-PAGE und vor allem während der sich daran anschließenden SDS-PAGE essentiell. Beide Inhibitoren wurden mit einer Endkonzentration von 1 mM im Solubilisierungspuffer eingesetzt. Abbildung 5.7 zeigt ein BN-Gel und zwei Aktivitätstests, bei denen vier verschiedene Proben von Rinderherzmitochondrien aufgetragen wurden. Zwischen den unbehandelten Mitochondrien und der mit der Protease versetzten Probe (1 und 2) zeigt sich erstaunlicherweise in der BN-PAGE kein Unterschied im Bandenmuster, ebenso ist kein Einfluss der Inhibitoren Pefabloc SC (3) und PMSF (4) zu erkennen. Alle Proben zeigen eine hohe Aktivität für Komplex I und Komplex IV, unabhängig davon, ob die Serin-Protease bzw. einer der Inhibitoren anwesend ist. Die Spuren der Rinderherzmitochondrien, die nur mit Enzym (2) und Enzym plus Pefabloc SC (3) versetzt wurden, zeigen eine leichte Verschiebung aller Banden in einen niedrigeren Molekularmassenbereich im Vergleich zu der unbehandelten und mit PMSF versetzten Probe. Dies deutet darauf hin, dass PMSF die Serin-Protease besser inhibiert als Pefabloc SC, da

hier kein Effekt der Verschiebung eintritt und damit der unbehandelten Probe am ähnlichsten ist. Diese Vermutung wird durch die 2D-Gele der verschiedenen Proben in Abbildung 5.8 bestätigt. Hier sind sehr große Unterschiede zwischen den Proben zu sehen. Gel A zeigt unbehandelte Rinderherzmitochondrien, während Gel B das Spotmuster zeigt, wenn die Protease zur Probe gegeben wird. Wird Pefabloc SC zur Probe hinzugegeben, um die Protease zu inhibieren, zeigt sich ein kaum verändertes Spotmuster (Gel C) im Vergleich zu der Probe, die nur mit dem Enzym versetzt wurde. Bei der mit PMSF versetzten Probe (Gel D) hingegen wird das Spotmuster der unbehandelten Probe fast vollständig erhalten. Erst im niedrigen Molekularbereich der ersten Dimension, was dem rechten oberen Quadranten des 2D-Gels entspricht, zeigt sich eine Proteindegradation, die auf das zugesetzte Enzym zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass PMSF als Inhibitor der Serin-Protease deutlich besser geeignet ist als Pefabloc SC.



**Abb. 5.7:** Mit Roti-Blue gefärbtes BN-Gel und Aktivitätstests der Komplexe I und IV. Aufgetragen wurden je 80 µg Protein von Rinderherzmitochondrien, solubilisiert mit einem Digitonin-zu-Protein-Verhältnis von 3 g/g. In den Spuren, die mit 1 bezeichnet sind, wurde BHM ohne Zusätze aufgetragen, während zu 2 die Nagarse-ähnliche bakterielle Protease, die bei der Isolierung zum Einsatz kam, vor der Solubilisierung zugegeben wurde (1 µg Enzym pro 100 µg mitochondriales Protein). Spuren 3 und 4 wurden ebenfalls mit der gleichen Menge Protease versetzt, allerdings enthielt hier der Solubilisierungspuffer die Serin-Protease-Inhibitoren AEBSF (Pefabloc SC, Spur 3) bzw. PMSF (Spur 4) mit einer Konzentration von 1 mM. Der Aktivitätstest von Komplex I wurde 60 min lang inkubiert, Komplex IV hingegen über Nacht, da nach 90 min erst wenig Präzipitat vorhanden war. Es ist deutlich zu erkennen, dass weder die Protease, noch einer ihrer Inhibitoren das Bandenmuster oder die Aktivität der Komplexe I und IV verändert. Die einzigen kleinen Unterschiede zeigen sich in Spuren 2 und 3, da hier die Banden leicht nach unten verschoben sind im Vergleich zu den Spuren 1 und 4.

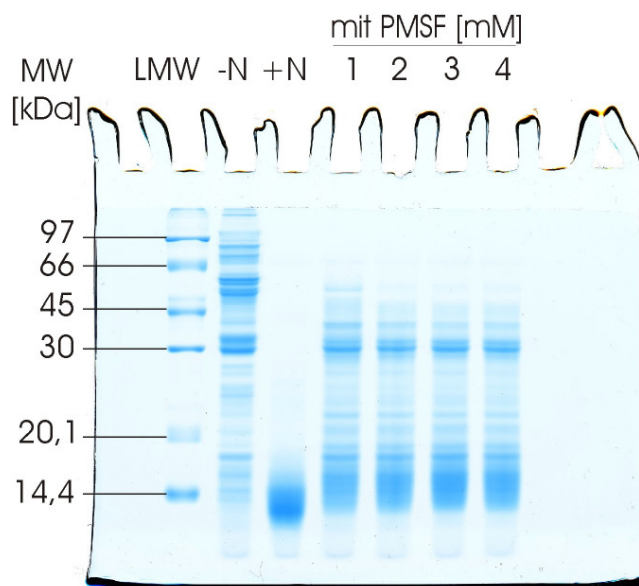


**Abb. 5.8:** Silbergefärbte 2D-BN-SDS-Gele. Aufgetragen wurden je 100 µg Protein von Rinderherzmitochondrien, solubilisiert mit einem Detergens-zu-Protein-Verhältnis von 3 g/g. Das Gel, das mit A bezeichnet ist, zeigt BHM ohne Zusätze, während bei Gel B eine Nagarse-ähnliche bakterielle Protease vor der Solubilisierung zur Probe zugegeben wurde (1 µg Enzym pro 100 µg mitochondriales Protein). Die Proben der Gele C und D wurden ebenfalls mit der gleichen Menge Protease versetzt, allerdings enthielt hier der Solubilisierungspuffer die Serin-Protease-Inhibitoren AEBSF (Pefabloc SC, Gel C) bzw. PMSF (Gel D) mit einer Konzentration von 1 mM. Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass die Protease die Protein-Untereinheiten oberhalb von ca. 45 kDa vollständig degradiert hat (Gel B), wobei die Stärke der Degradation antiproportional zur molekularen Masse der Proteine in der ersten Dimension ist. Durch Zusatz von Pefabloc SC in den Solubilisierungspuffer lässt sich der Degradationsgrad kaum senken (Gel C), während PMSF einen hohen Degradationsschutz bietet (Gel D). Zwar findet sich auch hier im niedrigen Massebereich der ersten Dimension (unteres Drittel des BN-Streifens) wenig Protein über einer Masse von 30 kDa und quasi kaum Protein über 45 kDa, allerdings sieht der hochmolekulare Bereich aus der ersten Dimension annähernd aus wie unbehandelte Rinderherzmitochondrien in Gel A. Bei allen Gelen ist jedoch zu sehen, dass der zu dem Gel dazugehörige BN-Gelstreifen keine Unterschiede zeigt, unabhängig davon, ob Protease oder Inhibitoren zugesetzt wurden. Erst mit der zweiten Dimension, einer SDS-PAGE, scheint die Degradation der Proteine vorstatten zu gehen.

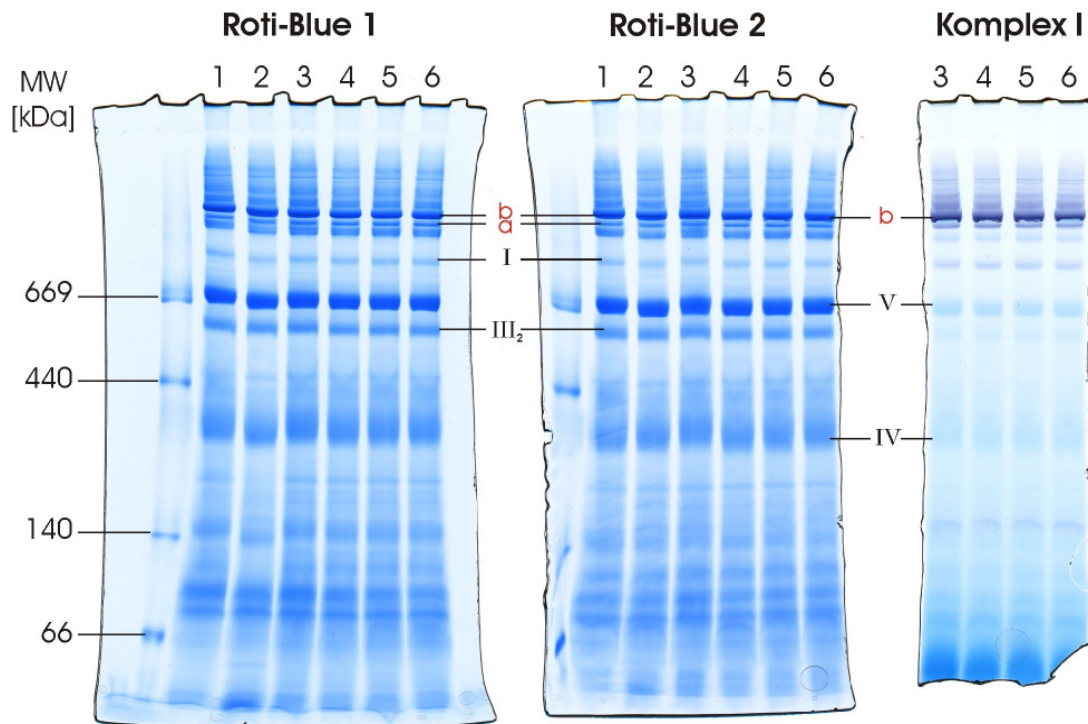


Da auch die Zugabe von 1 mM PMSF die Aktivität der Nagarse-ähnlichen Serin-Protease nicht komplett inhibieren konnte, stellt sich dementsprechend die Frage, ob mit einer Erhöhung der Inhibitorkonzentration die noch vorhandenen Degradationseffekte weiter gesenkt werden können. Um diese Fragestellung zu klären, wurden sowohl eine herkömmliche SDS-Gelelektrophorese als auch zwei BN-Gelelektrophoresen durchgeführt, die ebenfalls für 2D-Gele und einen Aktivitätstest verwendet wurden.

Bei der in Abbildung 5.9 gezeigten SDS-PAGE wurde PMSF in Konzentrationen von 1 bis 4 mM zu den mit der Protease versetzten Proben hinzugegeben. Das Gel zeigt sehr deutlich, dass mit einer Erhöhung der Inhibitorkonzentration keine Minimierung der Proteindegradation stattfindet. Es scheint eher das Gegenteil der Fall zu sein, denn die Spur mit einer Konzentration von 1 mM PMSF weist einige wenige distinkte Banden mehr auf als die Spuren mit 2 bis 4 mM. Allerdings ist bei keiner der Spuren eine fast vollständige Inhibition der Protease zu beobachten, wie sie von Wilson<sup>[109]</sup> beschrieben wurde, was eventuell darauf zurückzuführen ist, dass Nagarse effektiver durch PMSF inhibiert wird als das Nagarse-ähnliche Enzym, welches in dieser Arbeit zum Einsatz kam.



**Abb. 5.9:** Mit Roti-Blue gefärbtes SDS-Gel, auf das jeweils 10 µg Rinderherzmitochondrien aufgetragen wurden. In der Spur, die mit -N bezeichnet ist, wurde BHM ohne Zusatz von Nagarse-ähnlicher Protease aufgetragen, während in +N das Enzym zur Probe hinzugegeben wurde (1 µg Enzym pro 100 µg mitochondriales Protein). Die Proben in den weiteren Spuren wurden ebenfalls mit der gleichen Menge Protease versetzt, allerdings wurde hier ebenfalls der Serin-Protease-Inhibitor PMSF in verschiedenen Endkonzentrationen von 1 bis 4 mM zugegeben. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Protease die mitochondrialen Proteine quasi vollständig degradiert hat. Wird der Probe zusätzlich zum Enzym PMSF zugesetzt, kann der größte Teil des Bandenmusters unterhalb von ca. 55 kDa erhalten bleiben. Leider lässt sich oberhalb dieser Grenze keine ausgeprägte Bande mehr erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass PMSF die Protease nur zu einem gewissen Anteil inhibieren und in keiner Konzentration bis 4 mM die Degradation komplett verhindern kann. Überraschenderweise zeigt die Probe mit nur 1 mM PMSF die meisten Banden, es wurde hier also am wenigsten Protein degradiert.



**Abb. 5.10:** Mit Roti-Blue gefärbte BN-Gele und Aktivitätstest von Komplex I. Aufgetragen wurden je 80 µg Protein von Rinderherzmitochondrien, solubilisiert mit einem Detergens-zu-Protein-Verhältnis von 3 g/g. In den Spuren, die mit 1 bezeichnet sind, wurde reines BHM ohne Zusätze aufgetragen, während zu 2 eine bakterielle Protease vor der Solubilisierung zugegeben wurde (1 µg Enzym pro 100 µg mitochondriales Protein). Die Proben der Spuren 3 bis 6 wurden ebenfalls mit der gleichen Menge Protease versetzt, allerdings enthielt hier der Solubilisierungspuffer den Serin-Protease-Inhibitor PMSF mit Konzentrationen von 1 bis 4 mM. Die beiden mit Roti-Blue gefärbten Gele unterscheiden sich nur im Kathodenpuffer, der für die BN-Gelelektrophorese verwendet wurde. Bei dem mit Roti-Blue 2 bezeichneten Gel wurde dem normalen BN-Kathodenpuffer, der für das Gel Roti-Blue 1 verwendet wurde, 1 mM PMSF zugesetzt, um die inhibitorische Wirkung von PMSF während der Gelelektrophorese aufrecht zu erhalten. In diesem Fall wurde ebenfalls der B:10-Kathodenpuffer mit der gleichen Konzentration an PMSF versetzt. Der Gelstreifen mit den Spuren für den Aktivitätstest von Komplex I stammt aus dem Gel Roti-Blue 2 und wurde ca. 60 min lang inkubiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass weder die Protease, noch der Inhibitor unabhängig von dessen Konzentration das Bandenmuster oder die Aktivität von Komplex I verändern.

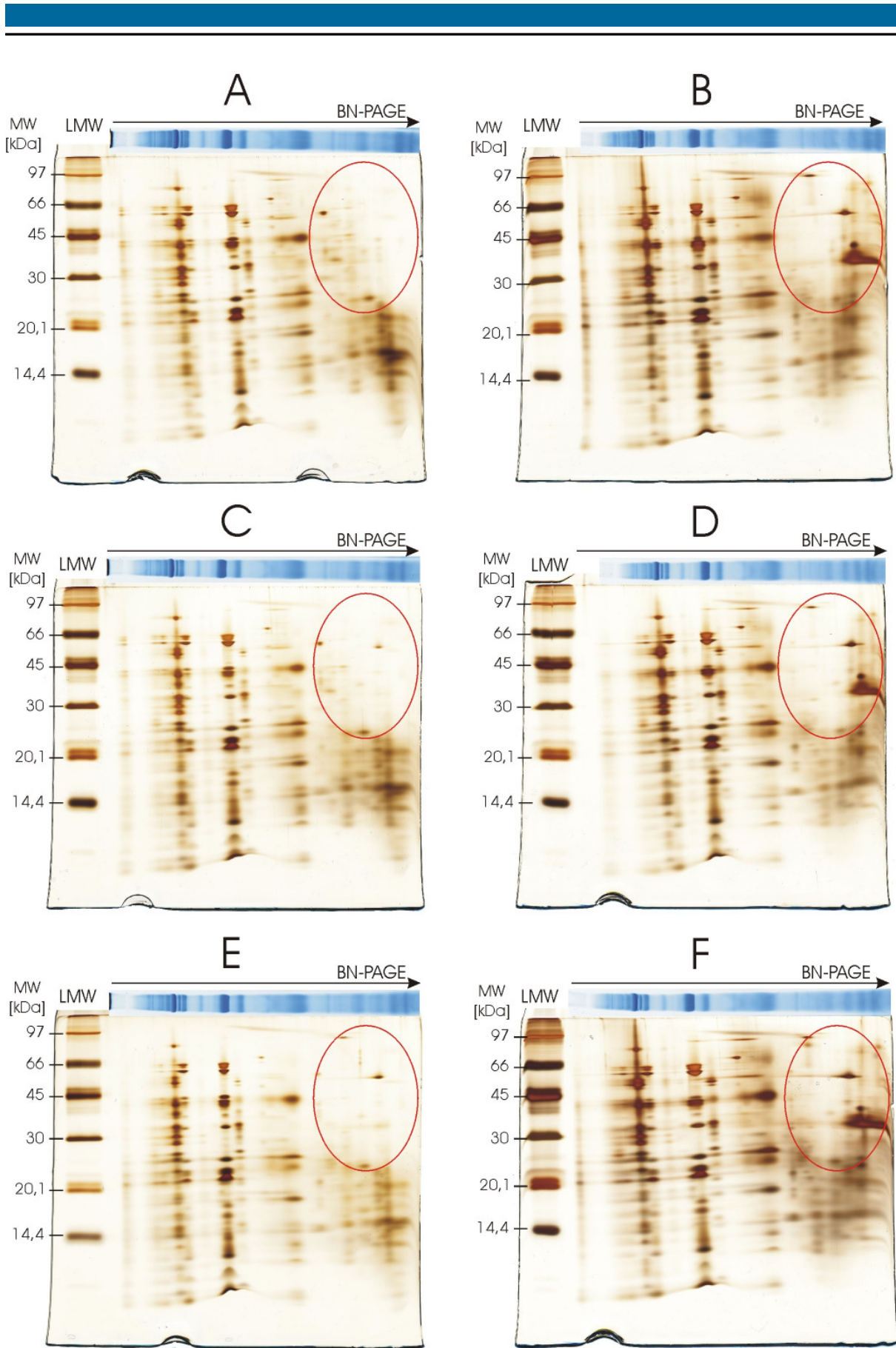
Für die BN-Gelelektrophorese wurden zwei Gele angefertigt, bei denen zwar dieselben Proben mit PMSF-Konzentrationen von 1 bis 4 mM aufgetragen wurden, jedoch nicht der gleiche Kathodenpuffer verwendet wurde. Da PMSF in Wasser nicht sehr lange stabil bleibt und durch Hydrolyse zerfällt, wurde bei dem zweiten BN-Gel PMSF mit einer Konzentration von 1 mM zu dem herkömmlichen Kathodenpuffer hinzugegeben, um die Dauer der Anwesenheit aktiven Inhibitors zu erhöhen. Des Weiteren wurde ein Aktivitätstest für Komplex I durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine Erhöhung der Inhibitorkonzentration die Aktivität beeinflusst. Die 2D-Gele wurden ebenfalls jeweils mit und ohne PMSF im Kathodenpuffer während der beiden Elektrophoreseschritte hergestellt.

---

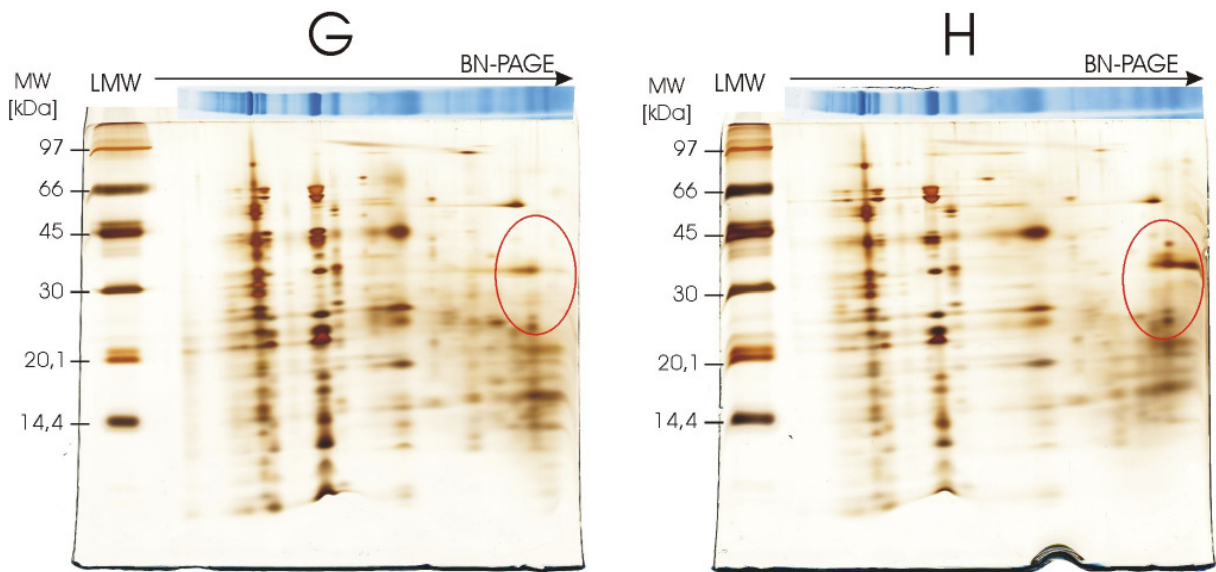
In Abbildung 5.10 sind die beiden BN-Gele gezeigt, die ohne (Gel Roti-Blue 1) und mit PMSF im Kathodenpuffer (Gel Roti-Blue 2) hergestellt wurden. Zwischen den beiden Gelen ist im Bandenmuster kein Unterschied feststellbar, ebenso wie in den Spuren mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors innerhalb des gleichen Gels. Der durchgeführte Aktivitätstest von Komplex I zeigt, dass eine schrittweise Erhöhung der Inhibitorkonzentration keinen Einfluss auf die Aktivität hat.

Ein etwas anderes Bild zeigt sich bei den 2D-Gele. Bei der Herstellung der 2D-Gele wurden für die Gelstreifen, die aus dem BN-Gel mit Inhibitor-enthaltenden BN-Kathodenpuffer stammten, sowohl die denaturierende Inkubationslösung mit 1% SDS / 1% Mercaptoethanol als auch der SDS-Kathodenpuffer mit 1 mM PMSF versetzt, um die inhibitorische Wirkung so lange wie möglich zu erhalten. In Abbildung 5.11 wurden die 2D-Gelpaare, mit und ohne PMSF im Kathodenpuffer, aller getesteten Konzentrationen gegenübergestellt. Für alle Konzentrationen zeigt sich, dass sich die Verwendung von PMSF in der Inkubationslösung und im Kathodenpuffer positiv auf das Spotmuster im rechten oberen Quadranten (rote Kreise markieren die Bereiche der größten Unterschiede) der 2D-Gele auswirkt (rechte Spalte). Ist PMSF nur während der Solubilisierung anwesend (linke Spalte), zeigen sich in den rot markierten Bereichen nur sehr wenige Proteine. Interessanterweise ist bei einer Konzentration von 4 mM PMSF während der Solubilisierung der geringste Unterschied zwischen den unterschiedlichen Kathodenpuffern zu erkennen, während bei allen anderen Konzentrationen das Ausmaß des Gewinns an inhibitorischer Wirkung sehr ähnlich ist. Damit bestätigen die 2D-Gele das Ergebnis der SDS-PAGE, dass eine höhere Konzentration des Inhibitors zu keiner Verringerung der Proteindegradation führt. Jedoch wird durch den Einsatz in Kathodenpuffern und Inkubationslösungen der inhibitorische Effekt leicht verstärkt. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Inhibitor in wässrigen Lösungen nicht sehr lange stabil bleibt und nach einiger Zeit zerfällt, womit eventuell die inhibitorische Wirkung nicht ausreicht, um das Enzym komplett zu inaktivieren. Wird hingegen während der Gelelektrophoresen und während der Denaturierung der Gelstreifen den verwendeten Lösungen und Puffern PMSF zugesetzt, werden damit mehr Enzyme inhibiert, die bei der herkömmlichen Prozedur ohne Inhibitor vermutlich weiterhin aktiv sind und zur hier gezeigten Proteindegradation führen.

Daraus ergibt sich für die in dieser Arbeit gezeigten Experimente mit interfibrillären Mitochondrien eine optimale Konzentration von 1 mM in allen Lösungen und Puffern, um die proteolytische Aktivität auf ein Minimum zu reduzieren. Bei allen zukünftigen Isolierungen von interfibrillären Mitochondrien empfiehlt es sich, PMSF sogar zu allen Puffern und Lösungen während der Isolierung hinzuzufügen, um schon von Anfang an einen Großteil der Enzyme zu inhibieren, vorzugsweise mit einer Konzentration von 1 mM.







**Abb. 5.11:** Silbergefärbte 2D-BN-SDS-Gele. Aufgetragen wurden je 100 µg Protein von Rinderherz-mitochondrien, solubilisiert mit einem Detergens-zu-Protein-Verhältnis von 3 g/g. Die Proben wurden vor der Solubilisierung mit einer Protease versetzt (1 µg Enzym pro 100 µg mitochondriales Protein). Zu allen Proben wurde der Serin-Protease-Inhibitor PMSF in verschiedenen Konzentrationen hinzu gegeben. Bei allen Gelen in der rechten Spalte wurde zusätzlich 1 mM PMSF in allen Kathodenpuffern während der Gelelektrophoresen eingesetzt, um die inhibitorische Wirkung zu verstärken. Bei den Gelen A und B wurde dem Solubilisierungspuffer PMSF mit einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt, bei C und D 2 mM, bei E und F 3 mM und bei G und H 4 mM PMSF. Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass bei allen eingesetzten Konzentrationen diejenigen Gele, bei denen während der Gelelektrophorese mit 1 mM PMSF versetzte Kathodenpuffer verwendet wurden (rechte Spalte), weniger degradierte Proteine im niedrigen Massebereich der ersten Dimension zeigen. Die Bereiche, die den größten Unterschied zeigen, sind rot markiert. Bei allen Gelen, unabhängig von der PMSF-Konzentration und unabhängig davon, ob PMSF auch im Kathodenpuffer vorhanden war oder nicht, ist zu erkennen, dass sich das Proteinmuster bis zu den rot markierten Bereichen kaum voneinander unterscheidet. Überraschenderweise ist bei einem Vergleich der Gele G und H der geringste Anstieg der inhibitorischen Wirkung von normalem zu PMSF-haltigem Kathodenpuffer zu erkennen. Vergleicht man nur die Gele der linken Spalte, in der die PMSF-Konzentration von 1 auf 4 mM ansteigt, erkennt man, dass mit steigender PMSF-Konzentration etwas weniger Protein in dem hauptsächlich betroffenen Bereich degradiert wurde. Im Gegensatz dazu zeigt sich in der rechten Spalte, dass sich bei PMSF-Zusatz in den Kathodenpuffer sehr wenig ändert bis zu einer Konzentration von 3 mM PMSF im Solubilisierungspuffer. Bei 4 mM plus Anwesenheit im Kathodenpuffer (Gel H) ist überraschenderweise mehr Protein degradiert worden als bei den niedrigeren Konzentrationen (Gele B, D und F).

---

## 5.4 Quantitative *In-Gel*-Aktivitätstests

Die Quantifizierung von Proteinen und deren Komplexe und Superkomplexe liefert einen Eindruck über die Vorgänge in den Mitochondrien während des Alterns oder der Kalorienrestriktion. Jedoch bedingt eine Änderung der Menge nicht zwangsläufig eine Änderung in der Aktivität. Um Änderungen in der Physiologie der Mitochondrien und deren Proteine aufdecken zu können, ist es hilfreich, Aktivitäten von Proteinen bzw. Proteinkomplexen und Superkomplexen zu ermitteln und diese mit den quantitativen Proteomdaten (siehe Kapitel 5.5.1 und 5.5.2) zu vergleichen.

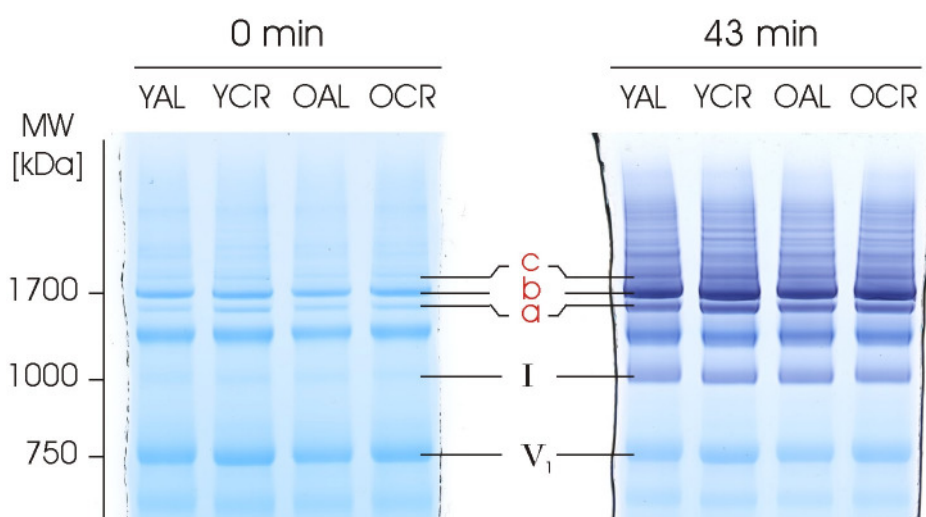
Mittels der blau-nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteinkomplexe und deren Superkomplexe nativ aufgetrennt werden, sodass sowohl deren Struktur als auch deren Aktivität erhalten bleibt. Mittels *In-Gel*-Aktivitätstests (siehe Kapitel 4.6) kann die Aktivität von Proteinkomplexen sowohl qualitativ als auch quantitativ durch Präzipitatbildung von umgesetzten Substraten in den entsprechenden Banden nachgewiesen werden. Der Vorteil einer Aktivitätsmessung in einer zuvor durch native Gelelektrophorese aufgetrennten Probe liegt in der Möglichkeit der eindeutigen Zuordnung der gemessenen Aktivitäten zu den entsprechenden Banden im Gel und damit zu den zugehörigen (Super-)Komplexen. Eine Quantifizierung der Aktivität kann erfolgen, indem das proportional zur Aktivität gebildete Präzipitat ins Verhältnis zur Proteinmenge gesetzt wird (Normierung der Tests siehe Kapitel 4.9.3). Diese relativen spezifischen Aktivitäten können sowohl für verschiedene Komplexe und Superkomplexe einer Probe als auch für denselben (Super-)Komplex in unterschiedlichen Proben miteinander verglichen werden.

### 5.4.1 Subsarcolemmale Mitochondrien aus Rattenherz

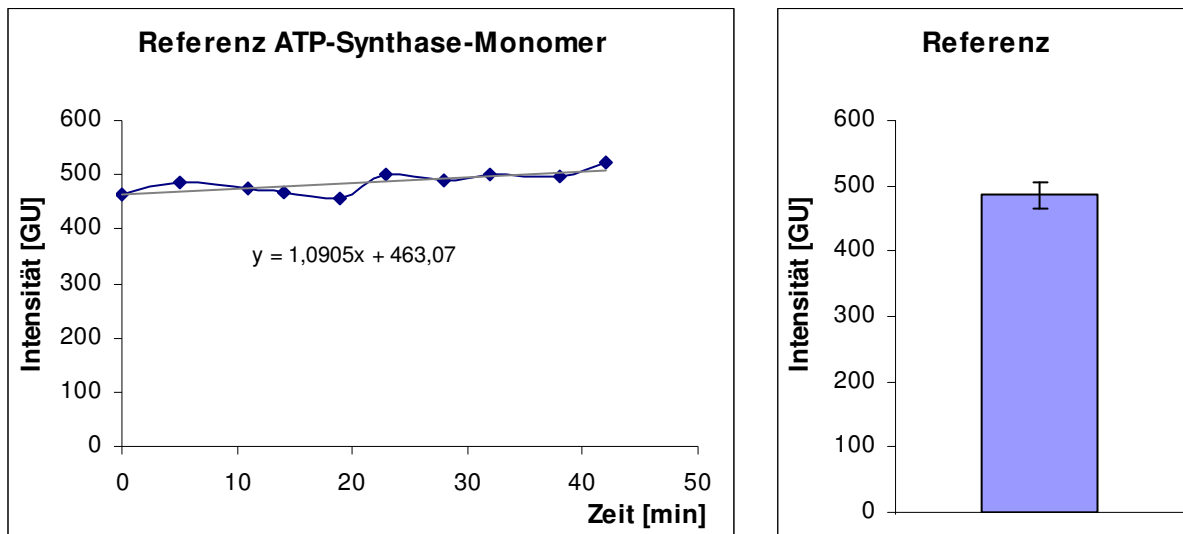
#### 5.4.1.1 Aktivität von Komplex I

Für den Aktivitätstest von Komplex I der subsarcolemmalen Mitochondrien wurden die Proben der Individuen zuvor gepoolt ( $n = 5$  für YAL und YCR,  $n = 6$  für OAL und OCR) und nativ geelektrophoretisch aufgetrennt. Die Inkubation in der NBT und reduziertes NADH enthaltenden Aktivitätstestlösung resultiert in einer Bildung von Formazan-Präzipitaten in denjenigen Banden im BN-Gel, in denen Aktivität von Komplex I vorhanden ist. Dabei ist die Geschwindigkeit der Bildung dieser violetten Präzipitate proportional zu der Aktivität des Komplexes. Durch Bestimmung der Grauwerte vor und zu 9 weiteren Zeitpunkten während der Inkubation in Aktivitätspuffer kann eine Kinetik der Präzipitatbildung aufgenommen werden.

Die Abbildung 5.12 zeigt einen Ausschnitt des ausgewerteten BN-Gels zu den Zeitpunkten 0 und 43 min, die jeweils den Start- und Endpunkt der Messung darstellen. Die in der Abbildung angezeigten Banden wurden ausgewertet. Dazu gehören sowohl der individuelle Komplex I als auch die Superkomplexe a, b, und c. Obwohl weitere Komplex I-aktive Banden vornehmlich in einem noch höheren Massebereich als Superkomplex c zu erkennen sind, wurden diese nicht ausgewertet. Ab einer gewissen molekularen Masse wird sowohl die Zuordnung der Banden als auch die akkurate Trennung der Banden von einander immer schwieriger. Des Weiteren ist eine Vielzahl der Banden mit einer Größe von über 2 MDa bezüglich ihrer stöchiometrischen Zusammensetzung bisher noch nicht hinreichend charakterisiert. Da allerdings der Anstieg der Grauwerte über die Zeit auf die anfängliche Proteinmenge von Komplex I innerhalb eines Superkomplexes normiert werden muss, ist die Kenntnis der Stöchiometrie des untersuchten Superkomplexes essentiell für eine korrekte Bestimmung der relativen spezifischen Aktivität. Um zu ermitteln, ob es während der Inkubation in Aktivitätstestpuffer zu unerwünschten Effekten wie das Anfärben des Hintergrundes aufgrund des gelblichen Puffers oder Entfärbung der Banden durch Inkubation in wässriger Lösung kommt, wird eine Bande des Monomers der ATP-Synthase ebenfalls über die Zeit ausgewertet. Diese Bande eignet sich besonders gut als Referenz, da sie recht isoliert von anderen Banden liegt und damit keine Gefahr besteht, dass sich in der direkten Umgebung durch Komplex I-Aktivität eine violette Hintergrundfärbung einstellt. Zudem ist sie selbst zum Startpunkt der Messung deutlich im ungefärbten Gel zu erkennen.



**Abb. 5.12:** Ausschnitt des BN-Gels der gepoolten subsarcolemmalen Mitochondrien zu Beginn (links) und zum Ende (rechts) des Aktivitätstests für Komplex I. Es wurden je 100 µg Protein mit einem Verhältnis von 3 g Digitonin pro g solubilisiert und aufgetragen. Man sieht in allen Spuren sehr deutlich eine sehr hohe Vielfalt an Komplex I-aktiven Banden mit Molekulargewichten bis weit über 2 MDa. Für die Auswertung des Aktivitätstests wurden allerdings nur der individuelle Komplex I sowie die drei rot markierten Superkomplexe a ( $I_1III_2$ ), b ( $I_1III_2IV_1$ ) und c ( $I_1III_2IV_2$ ) herangezogen. Das Monomer der ATP-Synthase ( $V_1$ ) wurde als Referenz ebenfalls für jeden Zeitpunkt ausgewertet.

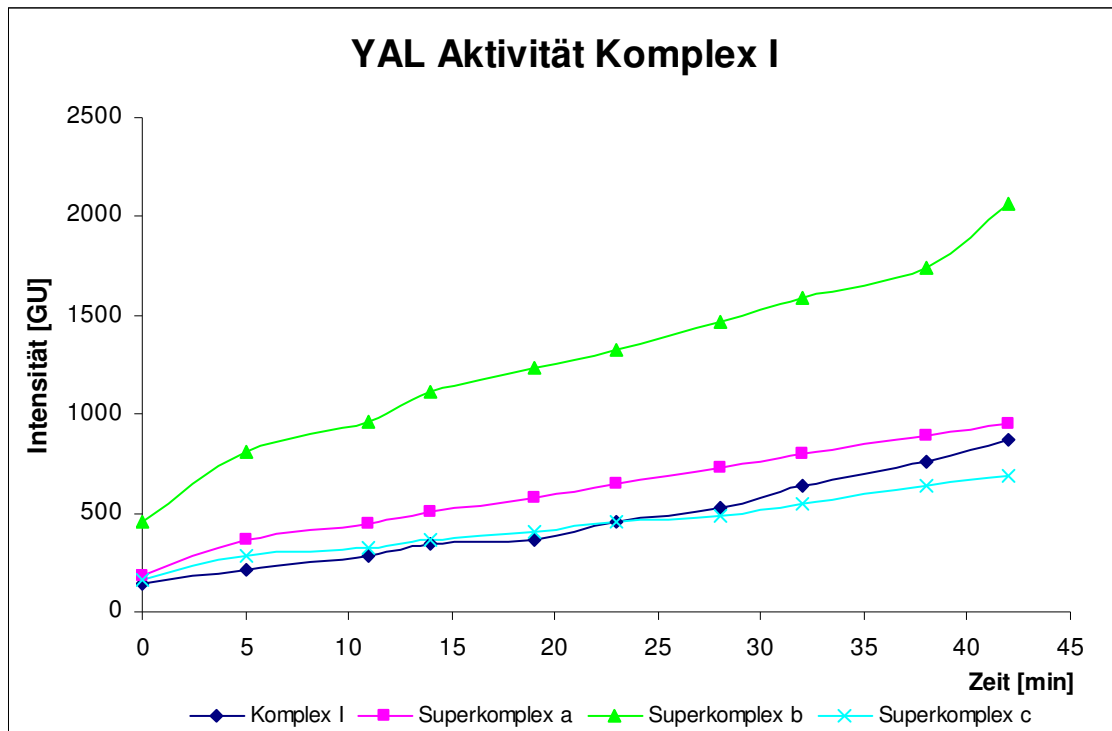


**Abb. 5.13:** Zeitlicher Verlauf der Intensität der Referenzbande des ATP-Synthase Monomers während des Aktivitätstests für Komplex I (links) und Standardabweichung der ermittelten Intensitäten (rechts). Zu 10 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Bandenintensität in GU der Referenzbande bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Es ist deutlich erkennbar, dass während des Tests so gut wie keine Änderungen in der Bandenintensität des ATP-Synthase Monomers auftreten und damit Färbe- oder Entfärbe-Effekte des kompletten Gels bei der Bestimmung der Intensitäten der Aktivität zeigenden Banden nicht berücksichtigt werden müssen.

Die Auswertung der Referenzbande in Abbildung 5.13 zeigt, dass die Intensität in Grauwert-Einheiten sich über die Gesamtzeit des Aktivitätstests von 43 min nur minimal ändert. Dies bestätigt auch die sehr geringe Standardabweichung der für jeden Zeitpunkt ermittelten Werte. Dies zeigt, dass es während der Inkubation des Gels in dem gelblichen Testpuffer zu keinen signifikanten Änderungen der Banden- oder Hintergrundintensität kommt, weder durch Gelb-Färbung des Gels noch durch Herauswaschen des im Gel vorhandenen Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250. Die leichte Steigung der Regressionsgeraden im zeitlichen Verlauf für die Referenzbande ist aufgrund der Intensitätszuwächse von einem Minimum mit über 500 bis hin zu deutlich mehr als 1500 Grauwert-Einheiten (siehe Abbildung 5.14) so minimal, dass sie vernachlässigt werden kann.

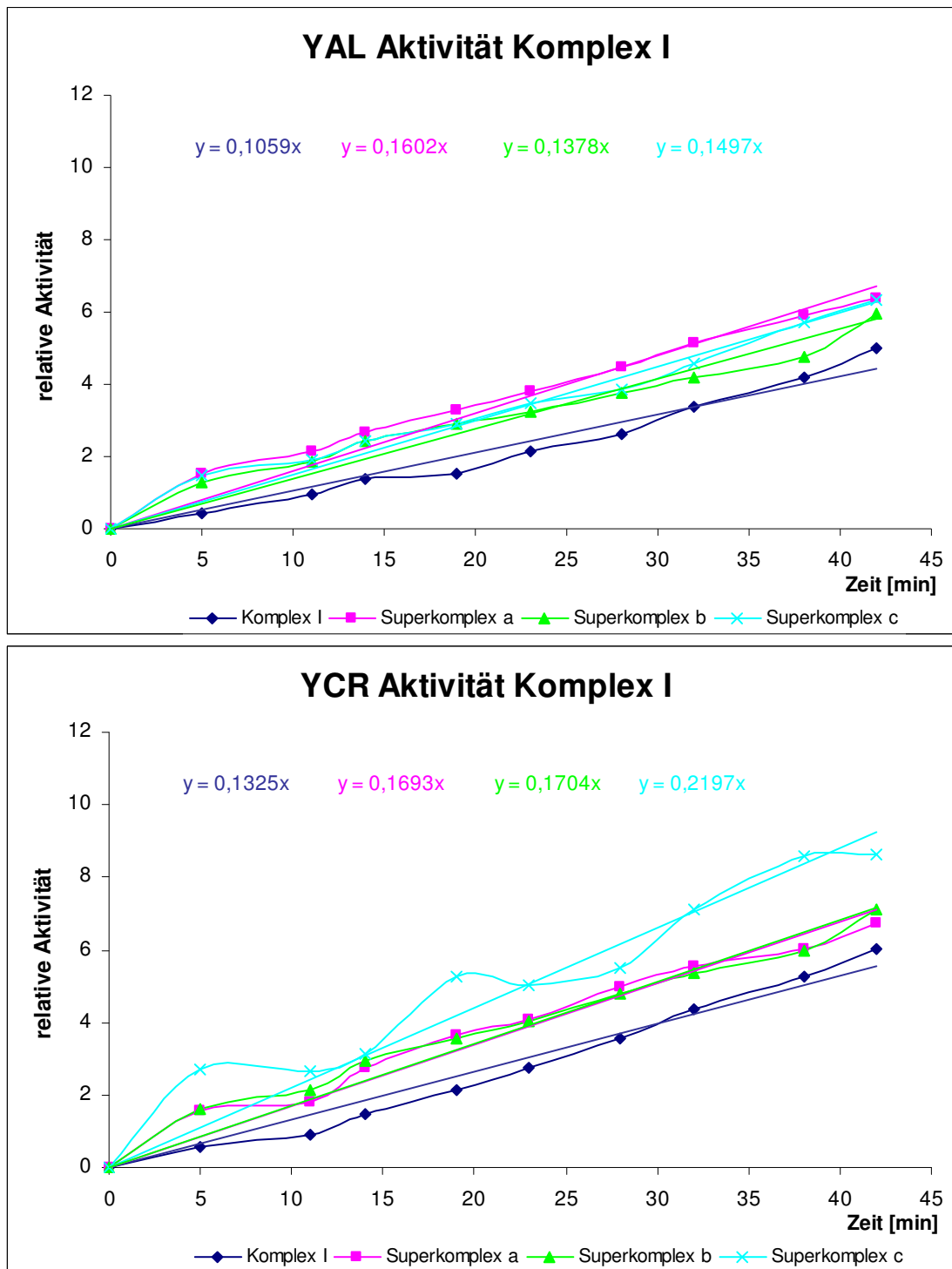
Die zeitliche Auftragung der Grauwert-Einheiten in Abbildung 5.14, beispielhaft für die YAL-Gruppe, zeigt deutlich, dass Superkomplex b ( $I_1III_2IV_1$ ) die höchste Aktivität zeigt (siehe auch Abbildung 5.12). Da allerdings die Menge von Superkomplex b im Vergleich zu den anderen untersuchten Komplexen etwa um das Dreifache erhöht ist und Komplex I innerhalb des Superkomplexes nur einen spezifischen Masse-Anteil an diesem besitzt, kann durch solch eine Auftragung der Absolutwerte keine Aussage über die relative spezifische Aktivität von Komplex I in Superkomplexen getroffen werden. Dafür ist eine Normierung auf die Menge von Komplex I zum Zeitpunkt vor der Inkubation in Aktivitätstestlösung erforderlich. Ist dieser mit anderen Atmungskettenkomplexen zu einem Superkomplex assoziiert, muss über die

Stöchiometrie der Anteil von Komplex I bestimmt werden und für die Normierung herangezogen werden. Jedoch lassen sich mit Hilfe einer Auftragung der Absolutwerte Rückschlüsse auf die Qualität und den Verlauf des Aktivitätstests ziehen. So ist deutlich zu erkennen, dass sich sowohl für Superkomplex b als auch für alle weiteren ausgewerteten (Super-)Komplexe eine Linearität im Anstieg der GU zeigt, ohne dass für eine Bande nach 43 min bereits eine Sättigung eintritt.

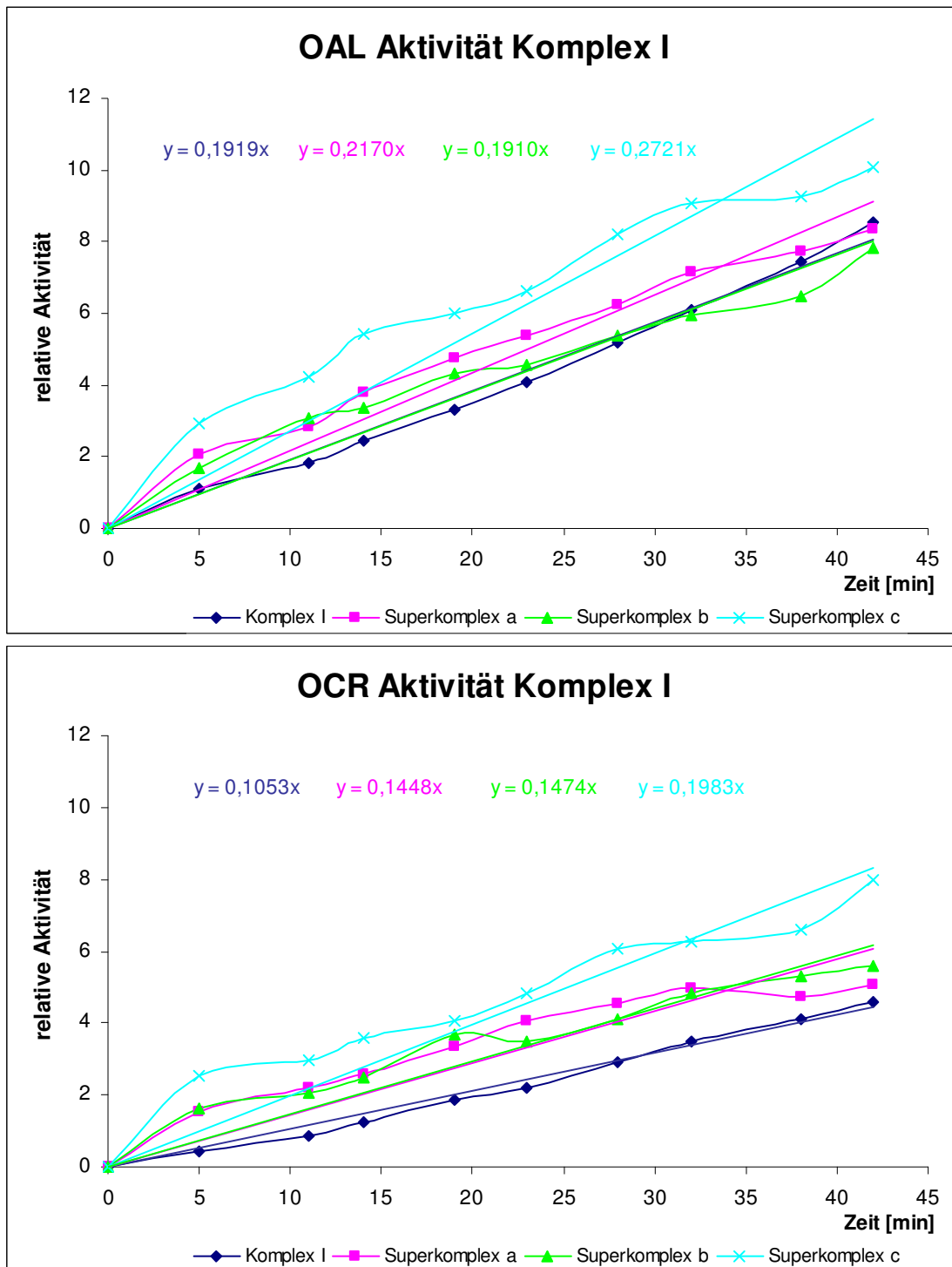


**Abb. 5.14:** Zeitlicher Verlauf der Bandenintensität während des Aktivitätstests für Komplex I der gepoolten subsarcolemmalen Mitochondrien der YAL-Gruppe. Zu 10 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Bandenintensität in GU von individuellem Komplex I sowie der Superkomplexe a ( $I_1III_2$ ), b ( $I_1III_2IV_1$ ) und c ( $I_1III_2IV_2$ ) ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Bei allen ausgewerteten Banden ist ein durchgängig linearer Aktivitätsverlauf zu erkennen. Da diese ermittelten Intensitäten die Absolutwerte darstellen, kann anhand dieser Zeitkurve ausschließlich die Qualität des durchgeführten Aktivitätstests beurteilt werden, nicht aber die eigentliche Aktivität von Komplex I als individueller Komplex oder in einem Superkomplex.

Die Abbildungen 5.15 und 5.16 zeigen die auf die Proteinmenge von Komplex I normierten Werte der relativen spezifischen Aktivität, die gegen die Zeit aufgetragen sind. Die so ermittelten Steigungen der Regressionsgeraden der verschiedenen Superkomplexe und Komplex I aller Proben sind sowohl in den jeweiligen Diagrammen als auch in Tabelle 5.3 und Abbildung 5.17 zum besseren Vergleich gezeigt. Für Tabelle 5.3 und Abbildung 5.17 ist zu beachten, dass die Steigungen mit einem Faktor von 1000 multipliziert worden sind, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen.



**Abb. 5.15:** Relative spezifische Aktivitäten für Komplex I der gepoolten subsarcolemmalen Mitochondrien für die Gruppen YAL und YCR. Zu 10 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Aktivität relativ zur Proteinmenge von Komplex I in den Banden von individuellem Komplex I sowie der Superkomplexe a ( $I_1III_2$ ), b ( $I_1III_2IV_1$ ) und c ( $I_1III_2IV_2$ ) ermittelt, gegen die Zeit aufgetragen und die Steigungen bestimmt. Bei beiden Gruppen der jungen Tiere ist unabhängig von konventioneller Ernährung und Kalorienrestriktion zu erkennen, dass der individuelle Komplex I die geringste relative spezifische Aktivität zeigt. Der Zusammenschluss von Komplex I mit weiteren Atmungskettenkomplexen zu Superkomplexen erhöht die Komplex I-Aktivität bei beiden Gruppen. Die Steigungen der Zeitkurven der YCR-Gruppe sind für alle untersuchten Komplexe und Superkomplexe größer als die der YAL-Gruppe.



**Abb. 5.16:** Relative spezifische Aktivitäten für Komplex I der gepoolten subsarcolemmalen Mitochondrien für die Gruppen OAL und OCR. Zu 10 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Aktivität relativ zur Proteinmenge von Komplex I in den Banden von individuellem Komplex I sowie der Superkomplexe a ( $I_1III_2$ ), b ( $I_1III_2IV_1$ ) und c ( $I_1III_2IV_2$ ) ermittelt, gegen die Zeit aufgetragen und die Steigungen bestimmt. Bei beiden Gruppen der alten Tiere ist unabhängig von konventioneller Ernährung und Kalorienrestriktion zu erkennen, dass der individuelle Komplex I die geringste relative spezifische Aktivität zeigt. Der Zusammenschluss von Komplex I mit weiteren Atmungskettenkomplexen zu Superkomplexen erhöht die Komplex I-Aktivität bei beiden Gruppen. Die Steigungen der Zeitkurven der OAL-Gruppe sind für alle untersuchten Komplexe und Superkomplexe etwa doppelt so groß wie die der OCR-Gruppe.



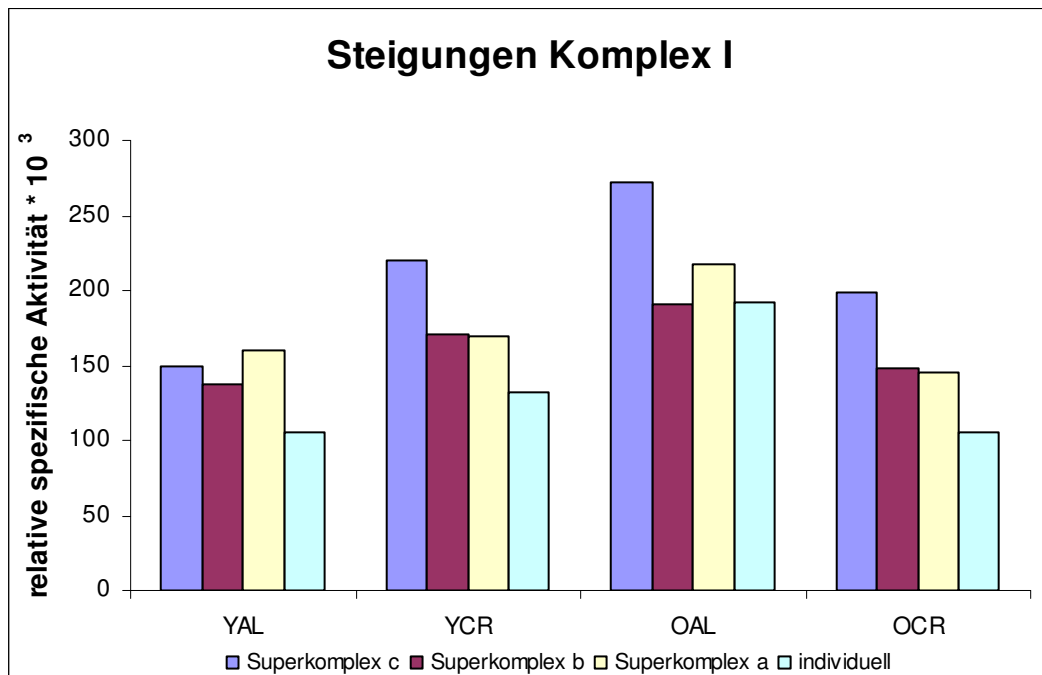
**Tab. 5.3:** Steigungen der Regressionsgeraden der relativen spezifischen Aktivität von Komplex I aus subsarcolemmalen Mitochondrien für die vier untersuchten Gruppen, multipliziert mit  $10^3$ .

	Steigungen der Regressionsgeraden [ $\text{min}^{-1} \cdot 10^3$ ]			
	YAL	YCR	OAL	OCR
<b>Superkomplex c</b>	149,7	219,7	272,1	198,3
<b>Superkomplex b</b>	137,8	170,4	191,0	147,4
<b>Superkomplex a</b>	160,2	169,3	217,0	144,8
<b>individueller Komplex I</b>	105,9	132,5	191,9	105,3

Die Steigungen der relativen spezifischen Aktivität über die Zeit, dargestellt in Tabelle 5.3 und Abbildung 5.17 lassen bei fast allen Proben erkennen, dass der individuelle Komplex I am wenigsten Aktivität zeigt. Einzig bei der OAL-Gruppe sind die Aktivitäten von individuellem Komplex I und Superkomplex b nahezu identisch. Prinzipiell lässt sich sagen, dass eine Assoziation von Komplex I mit Komplex  $\text{III}_2$  und gegebenenfalls zusätzlichem Komplex IV eine deutliche Erhöhung der Aktivität von Komplex I zur Folge hat. Superkomplex c ist bei allen Proben bis auf die der YAL-Gruppe am aktivsten. Die Gruppe der alten normal gefütterten Tiere zeigt bei allen Komplexen eine deutlich erhöhte Aktivität im Vergleich zu ihrem jungen Pendant. Hier liegt die Aktivität zwischen 35% für Superkomplex a bis hin zu 82% für Superkomplex c höher als in der Gruppe der jungen Individuen. Dieser Alternseffekt ist allerdings nur bei den normal gefütterten Ratten zu beobachten, denn alle untersuchten (Super-)Komplexe der OCR-Gruppe zeigen eine leichte Aktivitätsabnahme um bis zu maximal 20% bei individuellem Komplex I im Vergleich zur YCR-Gruppe. Im jungen Alter kommt es durch eine Kalorienrestriktion zu einer Erhöhung der Aktivitäten für die untersuchten Komplexe zwischen 6% für Superkomplex a und maximal 47% für Superkomplex c. Wird der Effekt der Kalorienrestriktion im hohen Alter betrachtet, fällt auf, dass hier keine Aktivitätserhöhung wie bei den jungen Tieren festgestellt werden kann. Im Gegenteil, es zeigen alle (Super-)Komplexe der OCR-Gruppe eine deutlich geringere Aktivität als die der OAL-Gruppe mit Abnahmen zwischen 23% bei Superkomplex b und 45% bei individuellem Komplex I.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass weder eine Alternsabhängigkeit noch eine Kalorienrestriktionsabhängigkeit bei den Proben zu beobachten ist, die für beide Paare (unterschiedliche Ernährung in der gleichen Altersklasse bzw. unterschiedliches Alter bei gleicher Ernährungsweise) eine Gültigkeit besitzt. Jedoch ist bei allen untersuchten Proben zu erkennen, dass individueller Komplex I am wenigsten Aktivität zeigt und die Assoziation mit Komplex  $\text{III}_2$  und Komplex IV eine teils deutliche Erhöhung der Aktivität von Komplex I bewirkt.





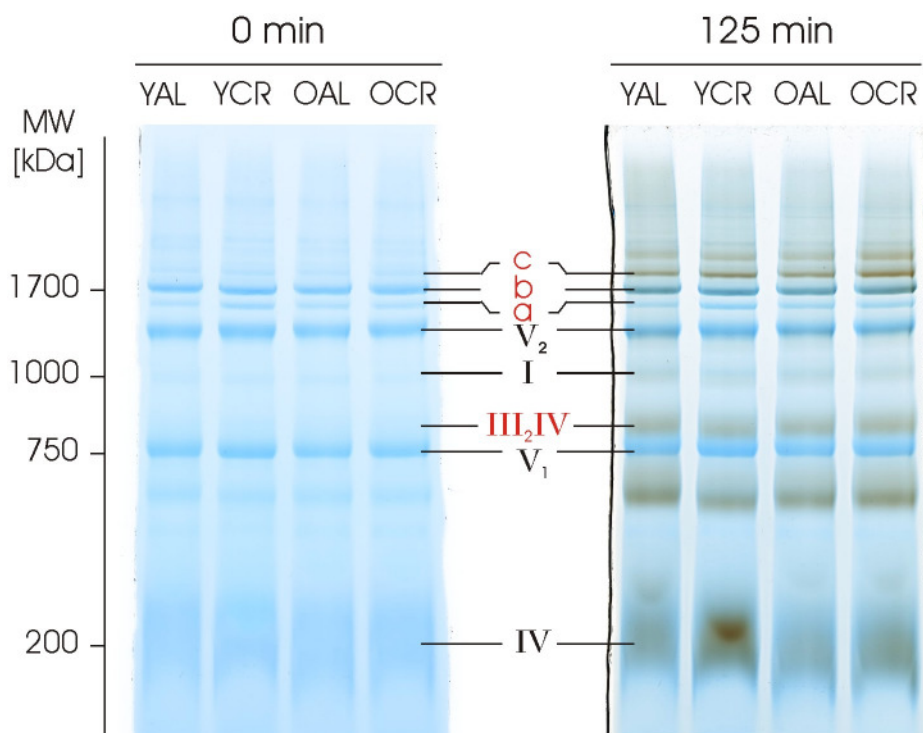
**Abb. 5.17:** Steigungen der Regressionsgeraden der relativen spezifischen Aktivität von Komplex I der subsarcolemmalen Mitochondrien für die vier Gruppen, multipliziert mit  $10^3$ . Für alle untersuchten (Super)-Komplexe zeigt die OAL-Gruppe die größten Steigungen und damit die höchste Aktivität.

#### 5.4.1.2 Aktivität von Komplex IV

Für den Aktivitätstest von Komplex IV wurden die zuvor zu Gruppen gepoolten Proben nativ mittels BN-PAGE aufgetrennt und die entsprechenden Spuren in Aktivitätstestlösung inkubiert. Durch aktiven Komplex IV im Gel werden Elektronen von reduziertem Cytochrom c auf DAB übertragen, das durch Polymerbildung in den entsprechenden Banden im Gel präzipitiert. Auch hier ist analog zum Aktivitätstest für Komplex I die Bildung an Präzipitat proportional zur Aktivität, was die Möglichkeit eröffnet, Einzelaktivitäten von individuellem Komplex IV und Komplex IV-enthaltenden Superkomplexen zu messen.

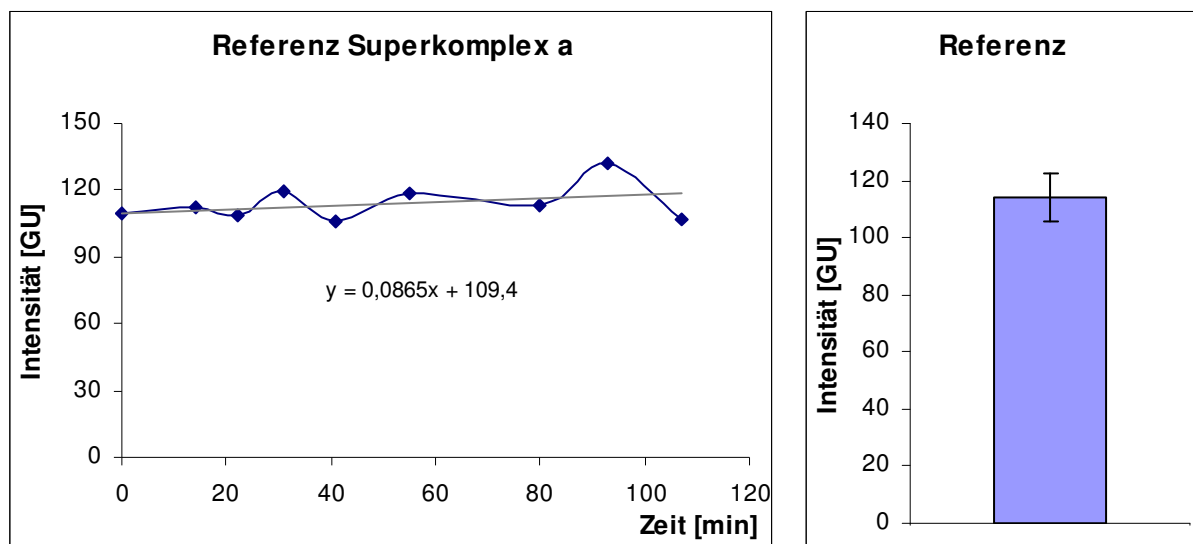
Die Inkubation in Aktivitätstestlösung erfolgte für 125 min, wobei direkt vor Beginn der Inkubation und zu weiteren neun Zeitpunkten während der Inkubation die Intensität der ausgewählten Banden bestimmt wurde. Abbildung 5.18 zeigt das BN-Gel zu Beginn und nach Abschluss des Aktivitätstests. Ausgewertet wurden sowohl der individuelle Komplex IV als auch die Superkomplexe  $III_2IV$ , b ( $I_1III_2IV$ ) und c ( $I_1III_2IV_2$ ). Superkomplex a wurde als Referenz ebenfalls zu jedem Zeitpunkt ausgewertet, um zu überprüfen, ob es zu Färbe- oder Entfärbe-Effekten während der Inkubation in Aktivitätstestlösung kommt.

Superkomplex a wurde als Referenzbande ausgewählt, da dieser Superkomplex kein Komplex IV enthält und, wie in Abbildung 5.18 zu sehen, eine distinkte Bande bildet. Der Aktivitätstest zeigt allerdings deutlich mehr braun gefärbte Banden als die, die ausgewertet wurden, jedoch überlappen diese teilweise oder vollständig mit anderen Komplexen, sodass eine Quantifizierung hier nicht möglich ist. Dies trifft beispielsweise auf das Dimer von Komplex IV zu, die braune Bande unterhalb des ATP-Synthase-Monomers, die fast vollständig mit Komplex III<sub>2</sub> überlappt. Ebenso sind schwache überlappende braune Banden im Bereich um Komplex I und knapp unterhalb des ATP-Synthase-Dimers zu erkennen. Oberhalb des schwersten ausgewerteten Superkomplexes c ist eine weitere recht ausgeprägte Bande zu sehen und darüber in einigen unscharfen Banden noch leichtere Braunfärbungen. Diese Banden können nicht ausgewertet werden, da hier keine klare Trennung der Banden voneinander möglich ist. Des Weiteren ist die Zuordnung der Banden zu Superkomplexen mit einer molekularen Masse von über 2 MDa schwierig bis unmöglich, da eine Vielzahl dieser Banden im hohen Molekularmassenbereich bisher noch nicht hinsichtlich ihrer Stöchiometrie charakterisiert sind.



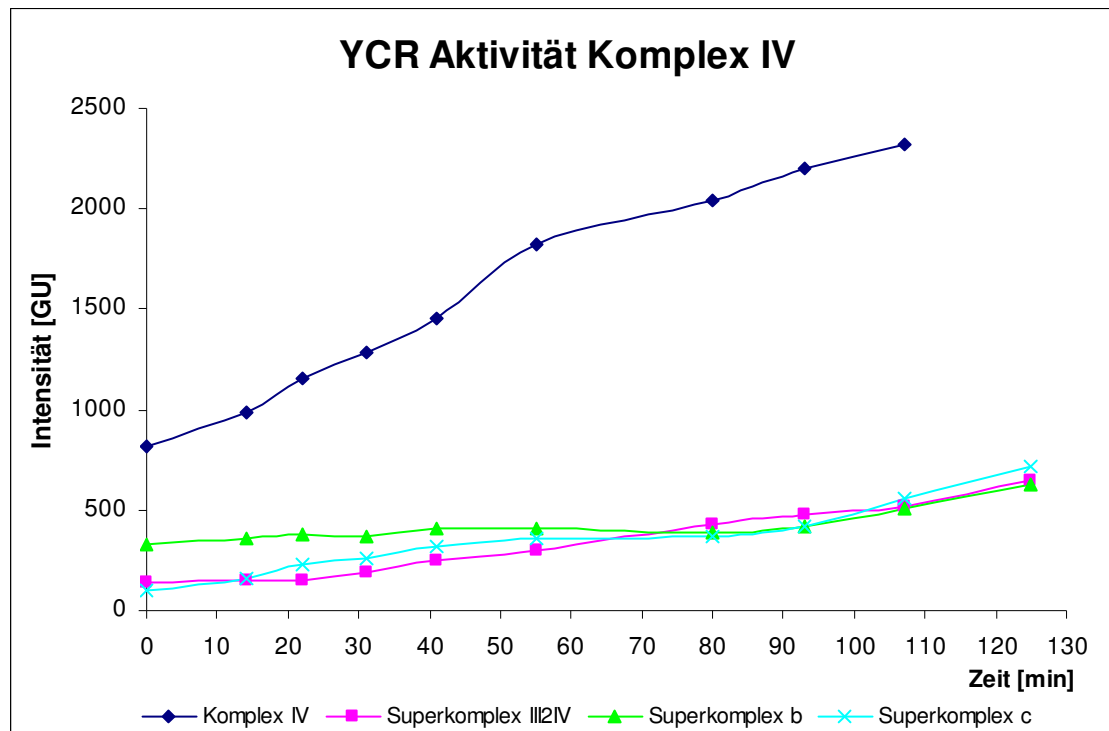
**Abb. 5.18:** Ausschnitt des BN-Gels der gepoolten subsarcolemmalen Mitochondrien zu Beginn (links) und zum Ende (rechts) des Aktivitätstests für Komplex IV. Es wurden je 100 µg mitochondriale Proteine mit einem Verhältnis von 3 g Digitonin pro g solubilisiert und aufgetragen. Man sieht in allen Spuren sehr deutlich eine große Vielfalt an Komplex IV-aktiven Banden mit Molekulargewichten bis über 2 MDa. Für die Auswertung des Aktivitätstests wurden allerdings nur der individuelle Komplex IV sowie die rot markierten Superkomplexe III<sub>2</sub>IV, b (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>) und c (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>) herangezogen. Superkomplex a wurde als Referenz ebenfalls für jeden Zeitpunkt ausgewertet.

Die Referenzbande Superkomplex a zeigt zwar in Abbildung 5.19 über die Zeit des Aktivitätstests einige Schwankungen, jedoch ist über die Gesamtzeit keine steigende oder fallende Tendenz zu erkennen. Dies bedeutet, dass ebenso wie für den Aktivitätstest von Komplex I keine Effekte der Anfärbung oder des Entfärbens des Hintergrundes vorhanden sind. Die Schwankungen sind bei Superkomplex a als Referenz im Vergleich zum ATP-Synthase-Monomer, das bei den Aktivitätstests für Komplex I als Referenz verwendet wird, verhältnismäßig etwas höher, was aber auf die geringeren Intensitäten in Grauwerten zurückzuführen ist. Die Standardabweichung von  $\pm 7\%$  vom Mittelwert ist zwar etwas höher als beim ATP-Synthase-Monomer, jedoch ist auch diese Abweichung noch gering genug, um Hintergrundeffekte vernachlässigen zu können.



**Abb. 5.19:** Zeitlicher Verlauf der Intensität der Referenzbande des Superkomplexes a (links) während des Aktivitätstests für Komplex IV und Standardabweichung der ermittelten Intensitäten (rechts). Zu 9 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Bandenintensität in GU der Referenzbande bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Es ist deutlich erkennbar, dass während des Tests so gut wie keine Änderungen in der Bandenintensität des Superkomplexes auftreten und damit Färbe- oder Entfärbefeffekte des kompletten Gels bei der Bestimmung der Intensitäten der Aktivität zeigenden Banden nicht berücksichtigt werden müssen.

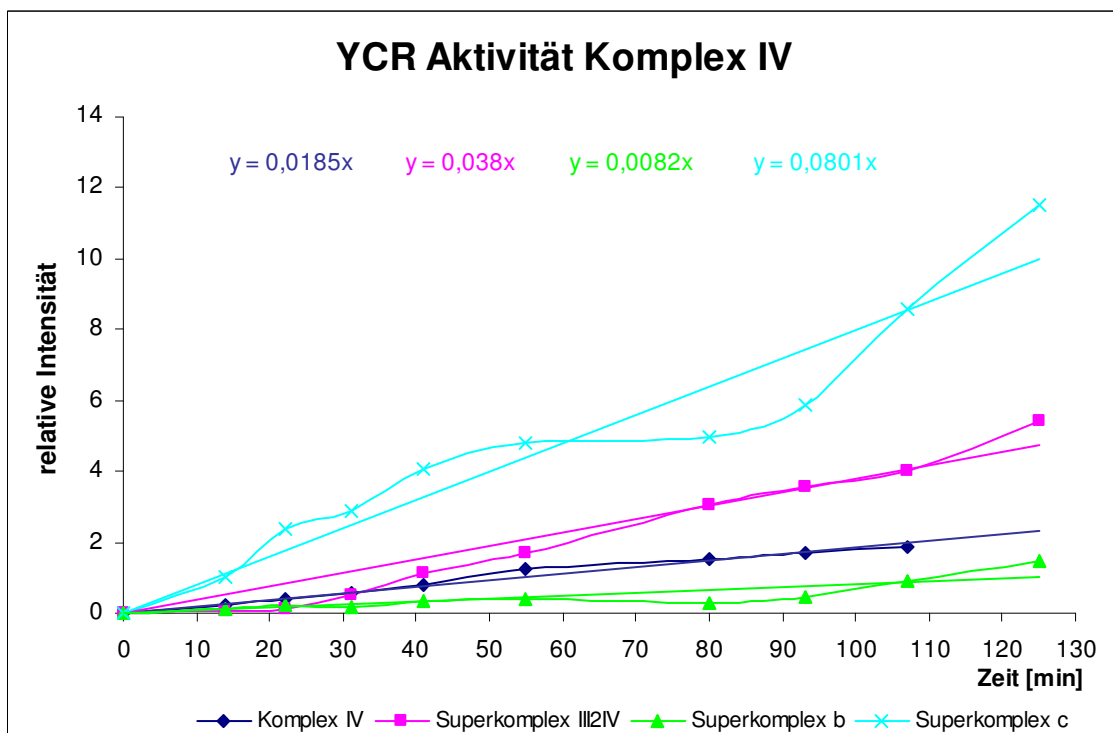
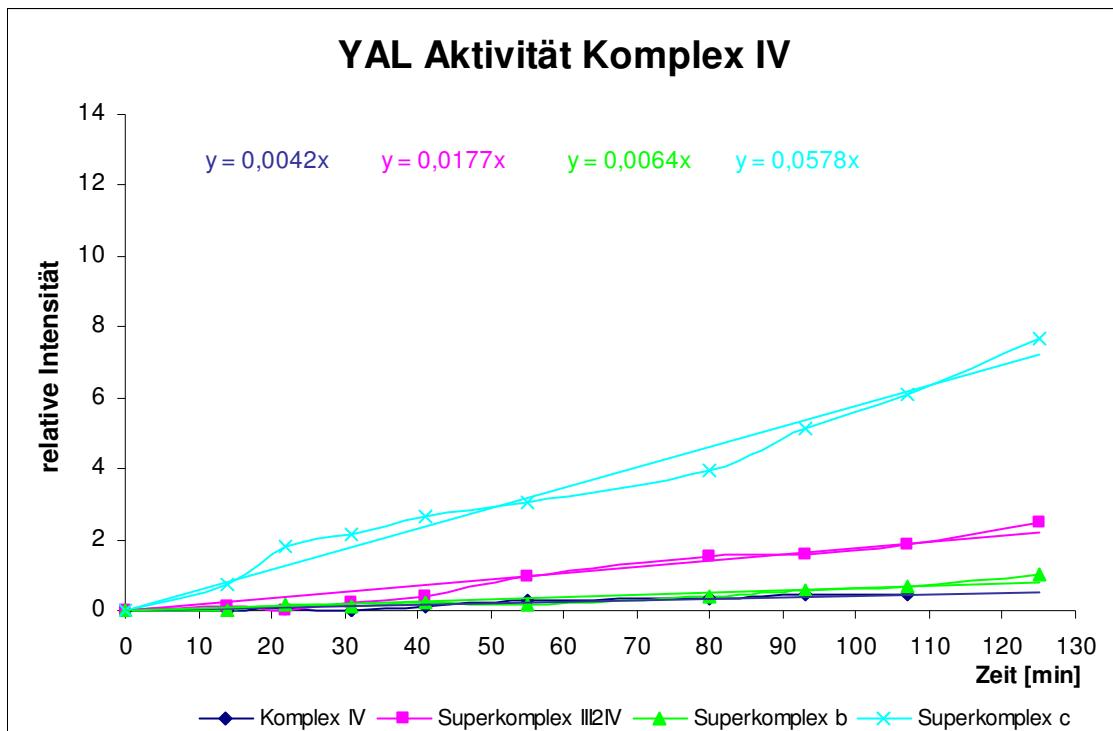
Abbildung 5.20 zeigt die gemessenen Intensitäten über die Zeit beispielhaft für die YCR-Gruppe. Es ist zu erkennen, dass individueller Komplex IV und die Superkomplexe III<sub>2</sub>IV und c einen linearen Anstieg in der Intensität zeigen. Nur bei Superkomplex b ist anfangs eine lange Plateauphase zu erkennen, die erst zum Ende hin in einen Anstieg mündet. Dies kann für alle anderen Proben auch beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls gilt für alle Gruppen das Fehlen des letzten Zeitpunktes für individuellen Komplex IV, da durch Luftblasenbildung unter dem Gel in diesem Bereich bei allen Spuren eine Quantifizierung nicht möglich war.



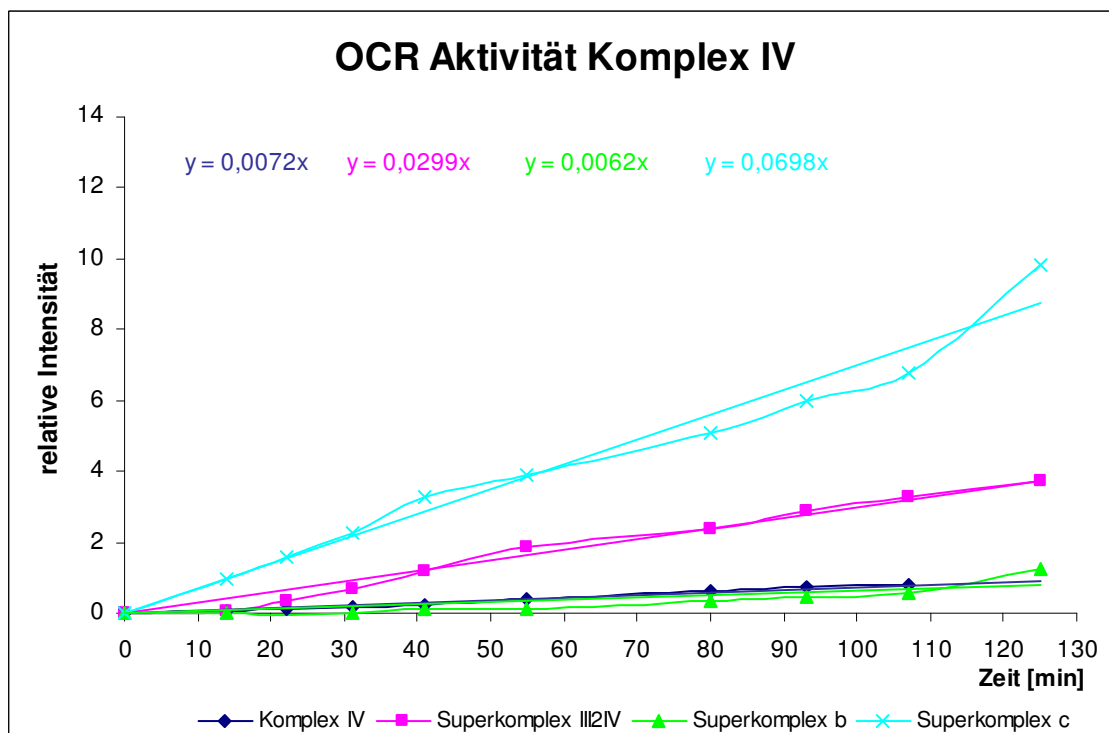
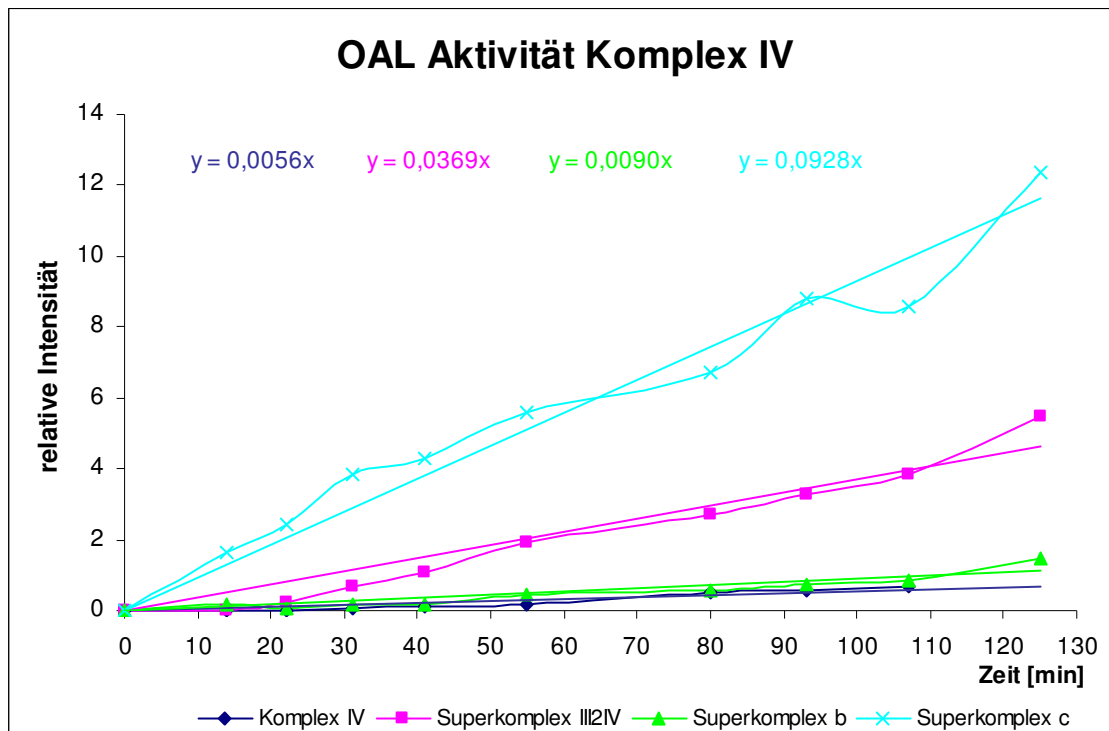
**Abb. 5.20:** Zeitlicher Verlauf der Bandenintensität während des Aktivitätstests für Komplex IV der gepoolten subsarcolemmalen Mitochondrien der YCR-Gruppe. Zu 10 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Bandenintensität in GU von individuellem Komplex IV sowie der Superkomplexe III<sub>2</sub>IV, b (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>) und c (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>) ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Bei fast allen ausgewerteten Banden ist ein durchgängig linearer Aktivitätsverlauf zu erkennen, nur Superkomplex b zeigt erst nach über einer Stunde einen Intensitätszuwachs. Da diese ermittelten Intensitäten die Absolutwerte darstellen, kann anhand dieser Zeitkurve ausschließlich die Qualität des Aktivitätstests beurteilt werden, nicht aber die eigentliche Aktivität von Komplex IV als individueller Komplex oder in einem Superkomplex.

Die Steigungen der relativen spezifischen Aktivitäten von allen ausgewerteten Banden der jeweiligen Gruppe sind sowohl in den Diagrammen der Abbildungen 5.21 und 5.22 als auch zur besseren Vergleichbarkeit mit einem Faktor von 1000 multipliziert, in Tabelle 5.4 und Abbildung 5.23 aufgeführt. Es ist für alle Gruppen deutlich erkennbar, dass Superkomplex c mit Abstand die höchste Aktivität besitzt. Bis auf die YCR-Gruppe zeigt bei allen anderen Gruppen der individuelle Komplex IV am wenigsten Aktivität. Ebenso fällt auf, dass Superkomplex b ebenfalls eine sehr niedrige Aktivität aufweist, die etwa im gleichen Bereich wie der schwache individuelle Komplex IV liegen.

Für die jungen Individuen zeigt sich wie schon für Komplex I (Kapitel 5.4.1.1) mit Kalorienrestriktion ein Anstieg der Aktivität in allen untersuchten Komplexen. Dies reicht von einem Minimum von 28% für Superkomplex b bis hin zu einem Aktivitätsanstieg von über 300% für individuellen Komplex IV. Diese kalorienrestriktionsbedingte Änderung ist jedoch nicht bei den alten Tieren zu beobachten. Hier ist für alle untersuchten Superkomplexe eine Verringerung der Aktivität durch eine Kalorienrestriktion zu erkennen, während der individuelle Komplex IV der OCR-Gruppe eine leicht höhere Aktivität zeigt im Vergleich zur OAL-



**Abb. 5.21:** Relative spezifische Aktivitäten für Komplex I der gepoolten subsarcolemmalen Mitochondrien für die Gruppen YAL und YCR. Zu 10 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Aktivität relativ zur Proteinmenge in den Banden von individuellem Komplex I sowie der Superkomplexe III<sub>2</sub>IV, b (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>) und c (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>) ermittelt, gegen die Zeit aufgetragen und die Steigungen bestimmt. Bei beiden Gruppen der jungen Tiere ist unabhängig von konventioneller Ernährung und Kalorienrestriktion zu erkennen, dass Komplex IV eine höhere Aktivität in den Superkomplexen c und III<sub>2</sub>IV zeigt als individuell. Der Zusammenschluss von Komplex IV mit weiteren Atmungskettenkomplexen zu Superkomplexen erhöht die Komplex IV-Aktivität bei beiden Gruppen. Die Steigungen der Zeitkurven der YCR-Gruppe sind für alle untersuchten Komplexe und Superkomplexe größer als die der YAL-Gruppe.

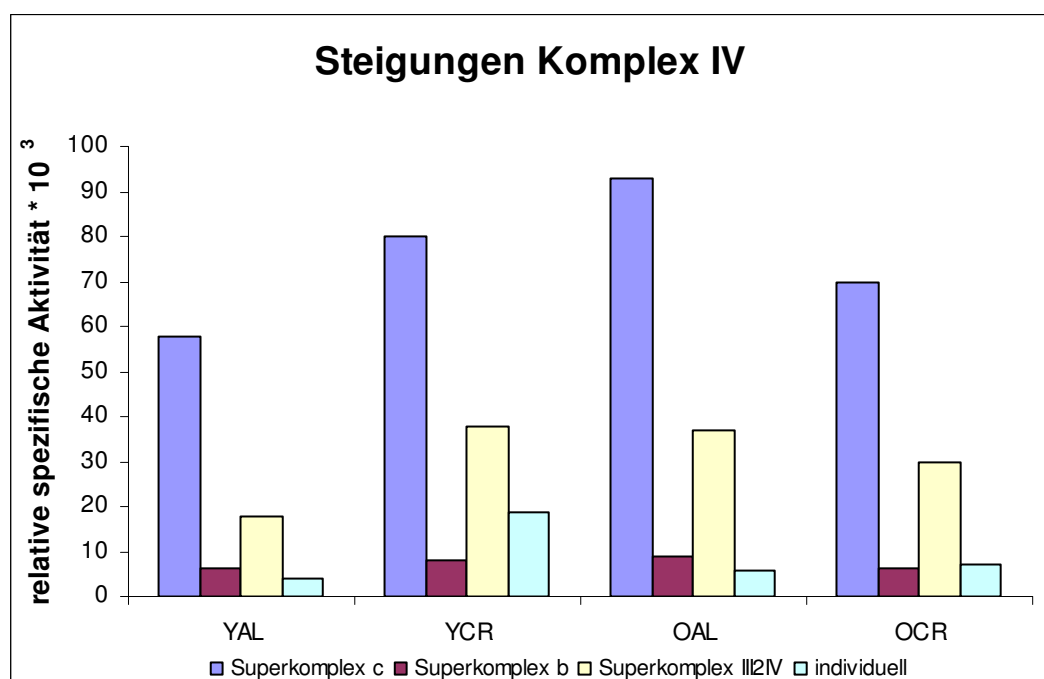


**Abb. 5.22:** Relative spezifische Aktivitäten für Komplex IV der gepoolten subsarcolemmalen Mitochondrien für die Gruppen OAL und OCR. Zu 10 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Aktivität relativ zur Proteinmenge in den Banden von individuellem Komplex IV sowie der Superkomplexe III<sub>2</sub>IV, b (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>) und c (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>) ermittelt, gegen die Zeit aufgetragen und die Steigungen bestimmt. Bei beiden Gruppen der alten Tiere ist unabhängig von konventioneller Ernährung und Kalorienrestriktion zu erkennen, dass Komplex IV eine höhere Aktivität in den Superkomplexen c und III<sub>2</sub>IV zeigt als individuell. Der Zusammenschluss von Komplex IV mit weiteren Atmungskettenkomplexen zu Superkomplexen erhöht die Komplex IV-Aktivität bei beiden Gruppen. Die Steigungen der Zeitkurven der OAL-Gruppe sind für die Superkomplexe größer als die der OCR-Gruppe.

Gruppe. Die Aktivitätsabnahmen liegen bei mindestens 19% für Superkomplex III<sub>2</sub>IV bis hin zu 32% für Superkomplex b. Eine Aktivitätserhöhung als Alternseffekt ist ebenfalls, wie bei Komplex I bereits festgestellt, nur für die normal gefütterten Tiere zu beobachten, während unter Kalorienrestriktion eine alternsabhängige Abnahme zu verzeichnen ist. Für die *ad libitum* gefütterten Tiere liegen die Aktivitätszunahmen zwischen 33% für den individuellen Komplex bis zu 108% für Superkomplex III<sub>2</sub>IV. Bei den Tieren mit Kalorienrestriktion zeigen sich während des Alterns hingegen Abnahmen in der Aktivität von 13% für Superkomplex c bis zu 61% beim individuellen Komplex IV.

**Tab. 5.4:** Steigungen der Regressionsgeraden der relativen spezifischen Aktivität von Komplex IV der subsarcolemmalen Mitochondrien für die vier untersuchten Gruppen, multipliziert mit 10<sup>3</sup>.

	Steigungen der Regressionsgeraden [ $\text{min}^{-1} \cdot 10^3$ ]			
	YAL	YCR	OAL	OCR
Superkomplex c	57,8	80,1	92,8	69,8
Superkomplex b	6,4	8,2	9,0	6,2
Superkomplex III <sub>2</sub> IV	17,7	38,0	36,9	29,9
individueller Komplex IV	4,2	18,5	5,6	7,2



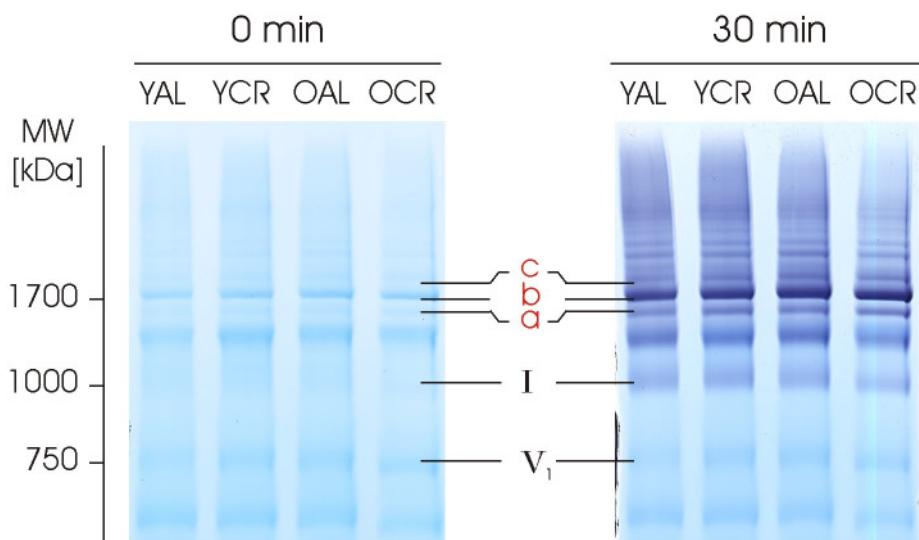
**Abb. 5.23:** Steigungen der Regressionsgeraden der relativen spezifischen Aktivität von Komplex IV aus subsarcolemmalen Mitochondrien für die vier untersuchten Gruppen, multipliziert mit 10<sup>3</sup>. Für alle Gruppen zeigt Superkomplex c mit Abstand die größten Steigungen und damit die höchste Aktivität.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass wie schon bei Komplex I keine allgemeingültigen Alternseffekte bzw. Effekte der Kalorienrestriktion für beide Ernährungsweisen bzw. Altersstufen feststellbar sind. Die Zu- und Abnahmen der Aktivität mit dem Altern und der Kalorienrestriktion zeigen die gleichen Tendenzen wie bei Komplex I. Bei allen Gruppen sind die Superkomplexe III<sub>2</sub>IV und c mit Abstand am aktivsten.

## 5.4.2 Interfibrilläre Mitochondrien aus Rattenherz

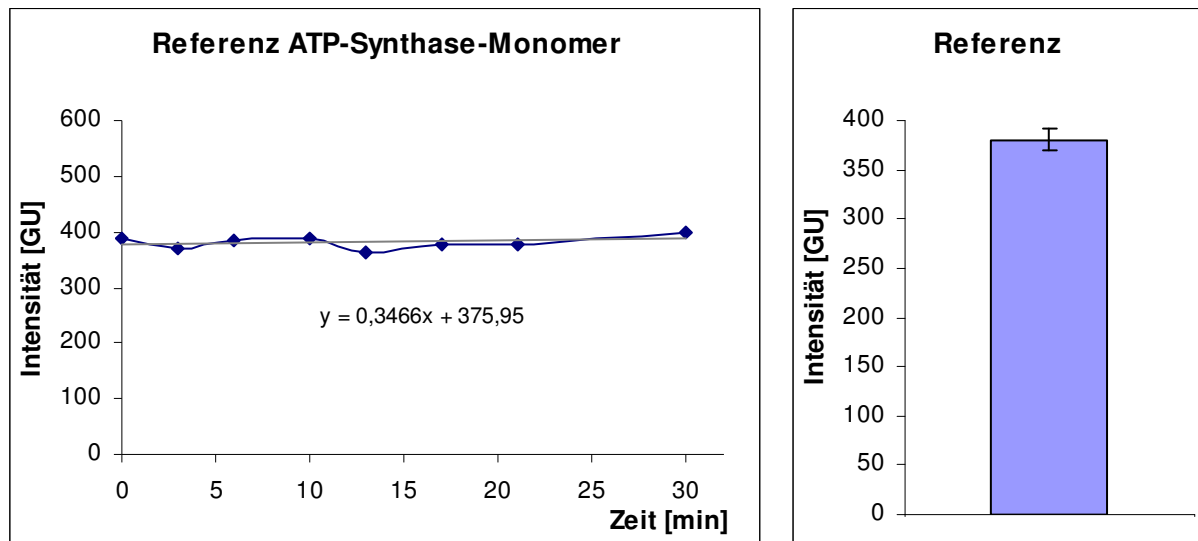
### 5.4.2.1 Aktivität von Komplex I

Der Aktivitätstest für Komplex I der gepoolten und über BN-PAGE aufgetrennten interfibrillären Mitochondrien zeigt, wie in Abbildung 5.24 zu sehen, ebenfalls wie bei den subsarcolemmalen Mitochondrien (siehe Kapitel 5.4.1.1) eine sehr hohe Bandenvielfalt speziell im Bereich über 2 MDa. Da auch hier die Stöchiometrie der Komplex I-aktiven Banden jenseits von Superkomplex c nicht bekannt ist, können diese für die Auswertung nicht herangezogen werden. Daher wurden ausschließlich die Banden des individuellen Komplexes I und der Superkomplexe a, b und c ausgewertet. Ebenso wie für das Monomer der ATP-Synthase als Referenz wurden für diese Banden vom Start bis zum Ende des Aktivitätstests nach 30 min 9 Mal die Intensitäten in Grauwert-Einheiten bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen.



**Abb. 5.24:** Ausschnitt des BN-Gels der gepoolten interfibrillären Mitochondrien zu Beginn (links) und zum Ende (rechts) des Aktivitätstests für Komplex I. Es wurden je 100 µg mitochondriale Proteine mit einem Verhältnis von 3 g Digitonin pro g solubilisiert und aufgetragen. Man sieht in allen Spuren sehr deutlich eine sehr hohe Vielfalt an Komplex I-aktiven Banden mit Molekulargewichten bis weit über 2 MDa. Für die Auswertung des Aktivitätstests wurden allerdings nur der individuelle Komplex I sowie die drei rot markierten Superkomplexe a (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>), b (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>) und c (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>) herangezogen. Das Monomer der ATP-Synthase (V<sub>1</sub>) wurde als Referenz ebenfalls für jeden Zeitpunkt ausgewertet.



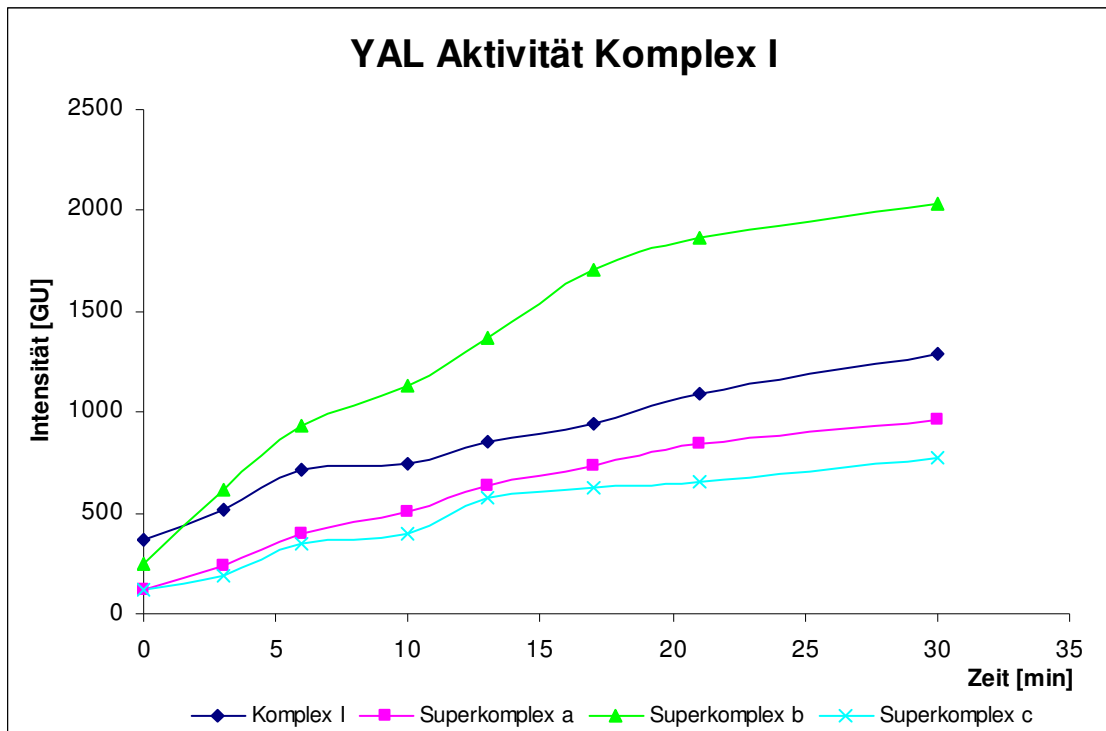


**Abb. 5.25:** Zeitlicher Verlauf der Intensität der Referenzbande des Monomers der ATP-Synthase während des Aktivitätstests für Komplex I (links) und Standardabweichung der ermittelten Intensitäten (rechts). Zu 8 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Bandenintensität in GU der Referenzbande bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Es ist deutlich erkennbar, dass während des Tests keine Änderungen in der Bandenintensität des ATP-Synthase Monomers auftreten und damit Färbe- oder Entfärbe-Effekte des kompletten Gels bei der Bestimmung der Intensitäten der Aktivität zeigenden Banden nicht berücksichtigt werden müssen.

Die Referenzbande, das Monomer der ATP-Synthase, zeigt über die Zeit des Aktivitätstests so gut wie keine Abweichungen. Abbildung 5.25 zeigt den Intensitätsverlauf der Bande über die Zeit und die Standardabweichung des Mittelwertes. Die Steigung der Regressionsgeraden und die Standardabweichung sind so minimal, dass Schwankungen der Hintergrundintensität durch Entfärben des Coomassie-Farbstoffs aus dem Gel oder Anfärbung des Gels durch die gelblich gefärbte Aktivitätstestlösung zu vernachlässigen sind. Das ATP-Synthase-Monomer wurde als Referenzbande ausgewählt, da sich in der direkten Nähe keine Banden befinden, von denen zu erwarten wäre, dass sie sich im Laufe des Tests aufgrund der Präzipitatbildung violett färben. Des Weiteren handelt es sich um eine recht prägnante Bande, die durch ihre Stärke zu jedem Zeitpunkt gut sichtbar und damit auch gut quantifizierbar ist.

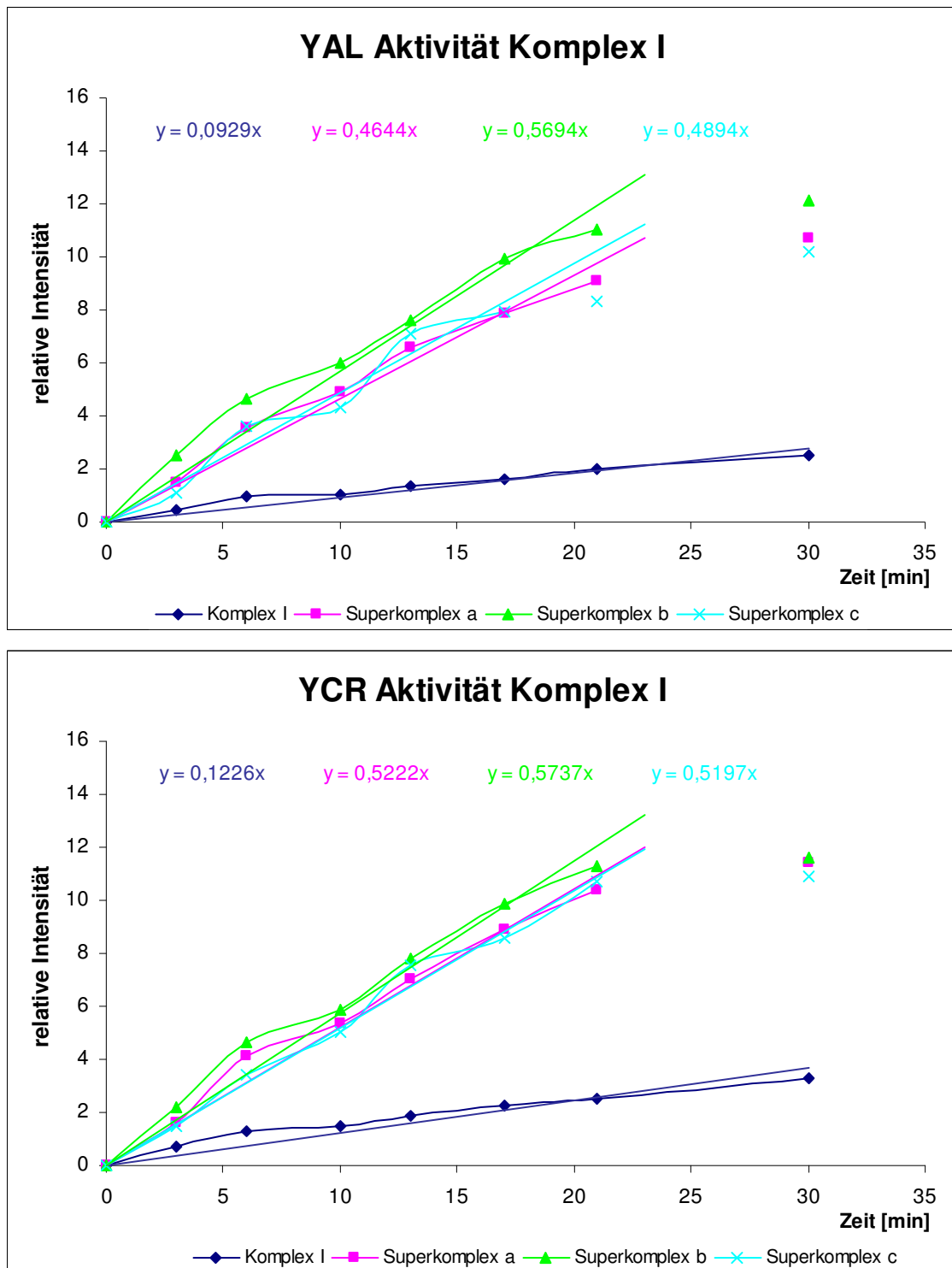
Abbildung 5.26 zeigt die Bandenintensitäten der ausgewerteten (Super-)Komplexe im Zeitverlauf für die YAL-Gruppe. Für alle ausgewerteten Banden ist eine Linearität feststellbar, jedoch ist deutlich zu sehen, dass die Kurven der Superkomplexe zum Ende des Aktivitätstests langsam in eine Sättigung eintreten. Dieses Verhalten ist auch bei allen anderen Gruppen für die Superkomplexe erkennbar (Daten nicht gezeigt). Superkomplex b zeigt mit einem Anstieg der Intensität von über 1700 GU über eine Zeit von 30 min den größten Aktivitätszuwachs. Da die Aktivität aber nicht auf den ganzen Superkomplex, sondern nur auf den im Superkomplex enthaltenen Komplex I zurückzuführen ist, ist eine Normierung des Präzipitatzuwachses auf

die Proteinmenge von Komplex I notwendig. Nach der Normierung werden relative spezifische Aktivitäten erhalten, die ebenfalls gegen die Zeit aufgetragen werden und ein direkt vergleichbares Maß für alle Banden innerhalb dieses Aktivitätstests darstellen.

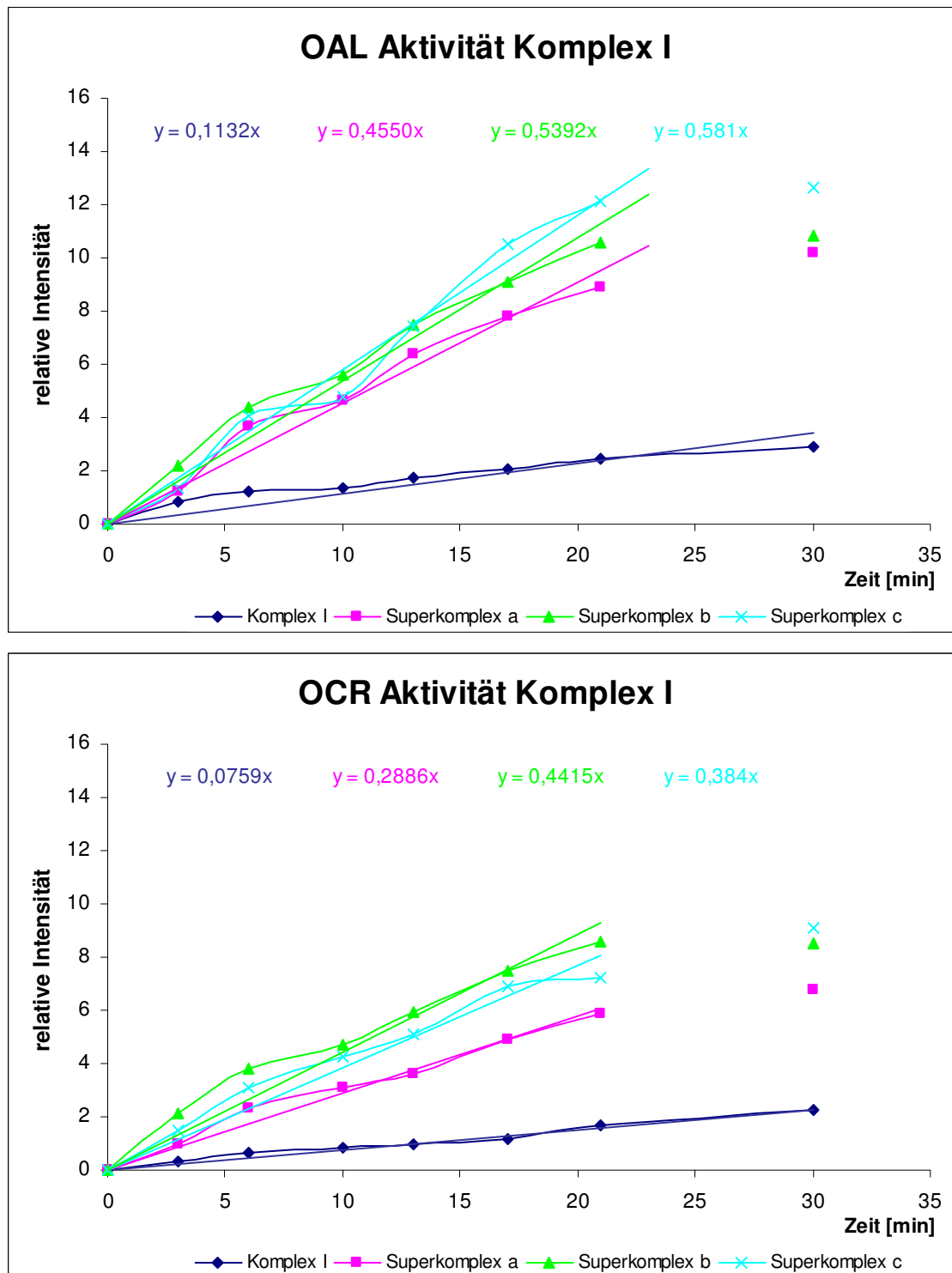


**Abb. 5.26:** Zeitlicher Verlauf der Bandenintensität während des Aktivitätstests für Komplex I der gepoolten interfibrillären Mitochondrien der YAL-Gruppe. Zu 8 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Bandenintensität in GU von individuellem Komplex I sowie der Superkomplexe a ( $I_1III_2$ ), b ( $I_1III_2IV_1$ ) und c ( $I_1III_2IV_2$ ) ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Bei allen untersuchten Superkomplexen ist zu erkennen, dass sich bereits nach dem vorletzten Zeitpunkt bei 21 min eine Sättigung einstellt. Da diese ermittelten Intensitäten die Absolutwerte darstellen, kann anhand dieser Zeitkurve ausschließlich die Qualität des durchgeführten Aktivitätstests beurteilt werden, nicht aber die eigentliche Aktivität von Komplex I als individueller Komplex oder in einem Superkomplex.

Die relativen spezifischen Aktivitäten über die Zeit für alle Proben sind den Abbildungen 5.27 und 5.28 zu entnehmen. Bei den vier Gruppen wurde jeweils der letzte Zeitpunkt bei 30 min nicht für die Regressionsgerade herangezogen, da der Kurvenverlauf in diesem Zeitbereich eindeutig einer Sättigung entgegen geht. Für Superkomplex c wurde bei der YAL-Gruppe ebenfalls der vorletzte Zeitpunkt bei 21 min nicht berücksichtigt, da sich sowohl in Abbildung 5.27 bei den relativen spezifischen Aktivitäten als auch in Abbildung 5.26 eine Sättigung in diesem Zeitbereich zeigt. Bei allen Gruppen unabhängig von Alter und Ernährung ist sehr deutlich zu erkennen, dass der individuelle Komplex I mit Abstand am wenigsten Aktivität zeigt. Das heißt, Komplex I ist in Assoziation mit anderen Atmungskettenkomplexen wie Komplex  $III_2$  und Komplex IV dazu in der Lage, eine höhere Aktivität zu erzielen als für sich alleine als individueller Komplex I.



**Abb. 5.27:** Relative spezifische Aktivitäten für Komplex I der gepoolten interfibrillären Mitochondrien für die Gruppen YAL und YCR. Zu 8 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Aktivität relativ zur Proteinmenge in den Banden von individuellem Komplex I sowie der Superkomplexe a ( $I_1III_2$ ), b ( $I_1III_2IV_1$ ) und c ( $I_1III_2IV_2$ ) ermittelt, gegen die Zeit aufgetragen und die Steigungen bestimmt. Bei beiden Gruppen der jungen Tiere ist unabhängig von konventioneller Ernährung und Kalorienrestriktion zu erkennen, dass der individuelle Komplex I mit Abstand die geringste relative spezifische Aktivität zeigt. Der Zusammenschluss von Komplex I mit weiteren Atmungskettenkomplexen zu Superkomplexen erhöht die Komplex I-Aktivität bei beiden Gruppen sehr deutlich. Für die Superkomplexe wurden die Werte bei 30 min nicht in die Regression miteinbezogen, da es nach dieser Zeit bereits zu Sättigungseffekten kommt.

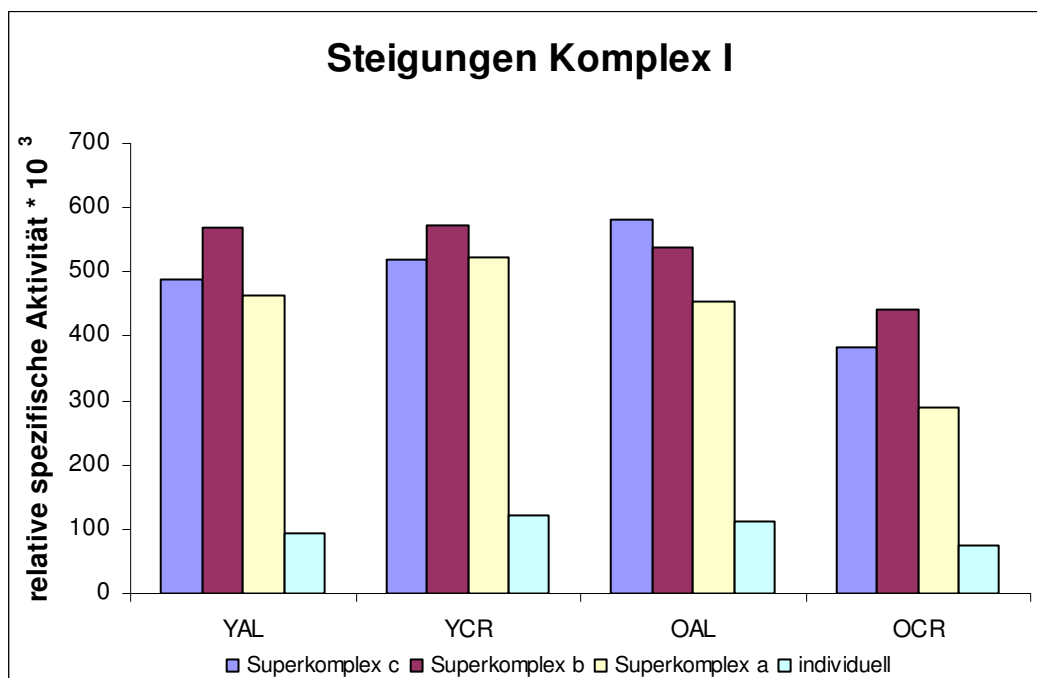


**Abb. 5.28:** Relative spezifische Aktivitäten für Komplex I der gepoolten interfibrillären Mitochondrien für die Gruppen OAL und OCR. Zu 8 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Aktivität relativ zur Proteinmenge in den Banden von individuellem Komplex I sowie der Superkomplexe a ( $I_1III_2$ ), b ( $I_1III_2IV_1$ ) und c ( $I_1III_2IV_2$ ) ermittelt, gegen die Zeit aufgetragen und die Steigungen bestimmt. Bei beiden Gruppen der alten Tiere ist unabhängig von konventioneller Ernährung und Kalorienrestriktion zu erkennen, dass der individuelle Komplex I die geringste relative spezifische Aktivität zeigt. Der Zusammenschluss von Komplex I mit weiteren Atmungskettenkomplexen zu Superkomplexen erhöht die Komplex I-Aktivität bei beiden Gruppen. Für die Superkomplexe wurden die Werte bei 30 min nicht in die Regression miteinbezogen, da es nach dieser Zeit bereits zu Sättigungseffekten kommt.

**Tab. 5.5:** Steigungen der Regressionsgeraden der relativen spezifischen Aktivität von Komplex I aus interfibrillären Mitochondrien für die vier untersuchten Gruppen, multipliziert mit  $10^3$ .

	Steigungen der Regressionsgeraden [ $\text{min}^{-1} \cdot 10^3$ ]			
	YAL	YCR	OAL	OCR
<b>Superkomplex c</b>	489,4	519,7	581,0	384,0
<b>Superkomplex b</b>	569,4	573,7	539,2	441,5
<b>Superkomplex a</b>	464,4	522,2	455,0	288,6
<b>individueller Komplex I</b>	92,9	122,6	113,2	75,9

Tabelle 5.5 und Abbildung 5.29 zeigen sehr deutlich, dass Komplex I in Superkomplexen bei allen Gruppen eine deutlich höhere Aktivität aufweisen als der individuelle Komplex I. Diese extreme Aktivitätserhöhung liegt im Minimum bei 280% für Superkomplex a der OCR-Gruppe bis hin zu einem Maximum von 513% bei Superkomplex b der YAL-Gruppe. Das bedeutet, dass Komplex I in Superkomplexen bis zu 6 Mal aktiver ist als im individuellen Zustand ohne andere assoziierte Atmungskettenkomplexe. Bei den Gruppen YAL, YCR und OCR zeigt Superkomplex b die höchste Aktivität der untersuchten (Super-)Komplexe innerhalb der Proben. Im Gegensatz dazu ist bei der OAL-Gruppe Superkomplex c als derjenige Komplex mit der höchsten Aktivität zu erkennen.



**Abb. 5.29:** Steigungen der Regressionsgeraden der relativen spezifischen Aktivität von Komplex I aus interfibrillären Mitochondrien für die vier untersuchten Gruppen, multipliziert mit  $10^3$ . Für alle Gruppen zeigt der individuelle Komplex I mit Abstand die geringsten Steigungen und damit die niedrigste Aktivität. Für die Superkomplexe können Aktivitäten von Komplex I detektiert werden, die bis zu 6 Mal höher liegen als die des individuellen Komplexes.

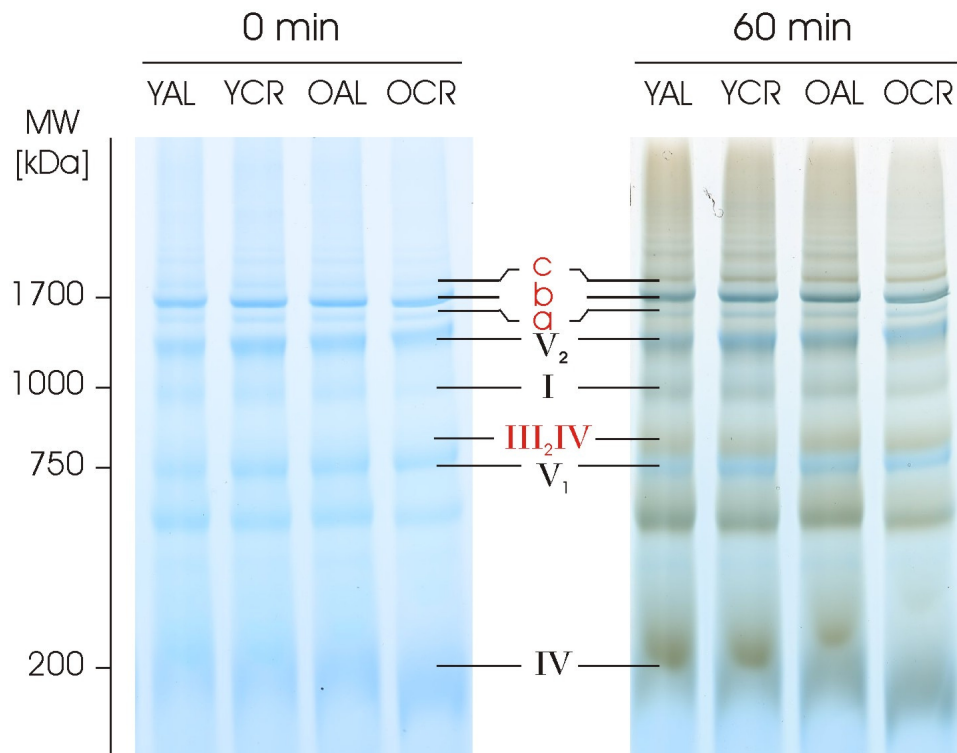
---

Bei den jungen Tieren bedingt eine Kalorienrestriktion eine leichte Erhöhung der relativen spezifischen Aktivität für den individuellen Komplex I und die Superkomplexe a und c. Superkomplex b bleibt quasi gleich, denn der Zuwachs von 0,8% ist so minimal, dass er auf leichte Schwankungen in der Auswertung zurückzuführen sein kann. Für die anderen (Super-)Komplexe ergeben sich Aktivitätserhöhungen zwischen 6% für Superkomplex a und 32% für den individuellen Komplex I. Für die normal gefütterten Tiere ergibt sich hinsichtlich altersassoziierter Änderungen ein uneinheitliches Bild. Während sich die Aktivitäten des individuellen Komplexes und des Superkomplexes c um 22% bzw. 19% erhöhen, zeigen sich für die beiden Superkomplexe a und b leicht verringerte Aktivitäten von 2% bzw. 5%. Bei den Tieren, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, ist die Tendenz klar zu erkennen. Da die OCR-Gruppe im Vergleich zu allen drei anderen Gruppen mit Abstand die niedrigsten Aktivitäten bei allen untersuchten (Super-)Komplexen aufweist, ergibt sich sowohl eine altersabhängige Abnahme der Aktivität bei den Tieren mit Kalorienrestriktion als auch eine CR-bedingte Abnahme bei den alten Tieren. Die größten Aktivitätsabnahmen der OCR-Gruppe belaufen sich auf 45% im Vergleich mit YCR und auf 37% im Vergleich mit OAL, beide für den Superkomplex b.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Aktivität aller untersuchten Superkomplexe im Vergleich zu individuellem Komplex I um ein Vielfaches erhöht ist, teilweise sogar um das 6-fache. Wie auch schon bei dem an subsarcolemmalen Mitochondrien durchgeführten Aktivitätstest für Komplex I zeigt sich eine leichte Erhöhung der Aktivität mit dem Alter für *ad libitum* gefütterte Tiere, jedoch eine Verringerung bei den CR-Tieren. Eine Kalorienrestriktion bedingt in jungem Alter eine Erhöhung der Aktivität, während im Alter eine erneute Erniedrigung festzustellen ist.

#### 5.4.2.2 Aktivität von Komplex IV

Der Aktivitätstest für Komplex IV wurde bei den interfibrillären Mitochondrien über eine Zeit von 60 min durchgeführt. Abbildung 5.30 zeigt das BN-Gel vor und nach der Inkubation in Aktivitätstestlösung. Es sind sehr viele braune Banden erkennbar, jedoch sind nur wenige davon gut quantifizierbar, da aufgrund von Überlappungen mit anderen Banden keine korrekte Quantifizierung möglich ist. Daher wurden die Banden für den individuellen Komplex IV sowie die Superkomplexe III<sub>2</sub>IV, b und c ausgewertet. Superkomplex a hat sich bereits als Referenz beim Komplex IV-Aktivitätstest der subsarcolemmalen Mitochondrien als sinnvoll erwiesen und wird dementsprechend auch hier als Referenz herangezogen.

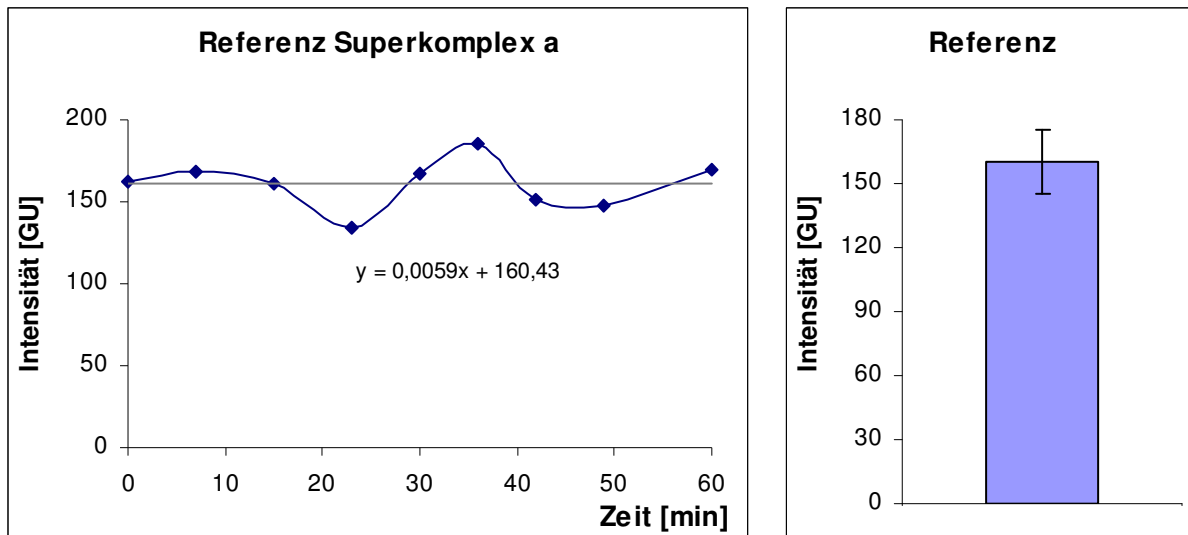


**Abb. 5.30:** Ausschnitt des BN-Gels der gepoolten interfibrillären Mitochondrien zu Beginn (links) und zum Ende (rechts) des Aktivitätstests für Komplex IV. Es wurden je 100 µg mitochondriale Proteine mit einem Verhältnis von 3 g Digitonin pro g solubilisiert und aufgetragen. Man sieht in allen Spuren sehr deutlich eine große Vielfalt an Komplex IV-aktiven Banden mit Molekulargewichten bis über 2 MDa. Für die Auswertung des Aktivitätstests wurden allerdings nur der individuelle Komplex IV sowie die rot markierten Superkomplexe III<sub>2</sub>IV, b (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>) und c (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>) herangezogen. Superkomplex a wurde als Referenz ebenfalls für jeden Zeitpunkt ausgewertet.

Die OCR-Spur des BN-Gels zeigt eine leichte Verzerrung der Banden nach oben auf der rechten Seite der Spur. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die OCR-Spur am rechten Rand des BN-Gels und damit in nur geringer Entfernung des Spacers in der Apparatur gelaufen ist. Für die Auswertung ist dies jedoch kein Problem, da mit der Auswertungssoftware auch nicht-horizontale Banden ausgewertet werden können.

Die Auswertung für die Referenzbande Superkomplex a in Abbildung 5.31 zeigt, dass die Intensität in Grauwert-Einheiten doch deutlich schwankt, die Regression zeigt allerdings so gut wie keine Steigung. Diese deutlichen Schwankungen der Referenzbande, die sich auch in einer etwas höheren Standardabweichung des Mittelwertes von  $\pm 9\%$  zeigen, wurden ebenfalls für die Bande von Superkomplex a beim Test der subsarcolemmalen Mitochondrien detektiert, die dort bereits als Referenz verwendet wurde. Dies ist auf die relativ geringen Intensitäten der Bande zurückzuführen. Trotz der vorhandenen Intensitätsschwankungen zeigt sich, dass unerwünschte Effekte im Gel wie Anfärbung durch den rot-braun gefärbten Aktivitätstestpuffer oder Entfärbung der Banden durch die Inkubation in

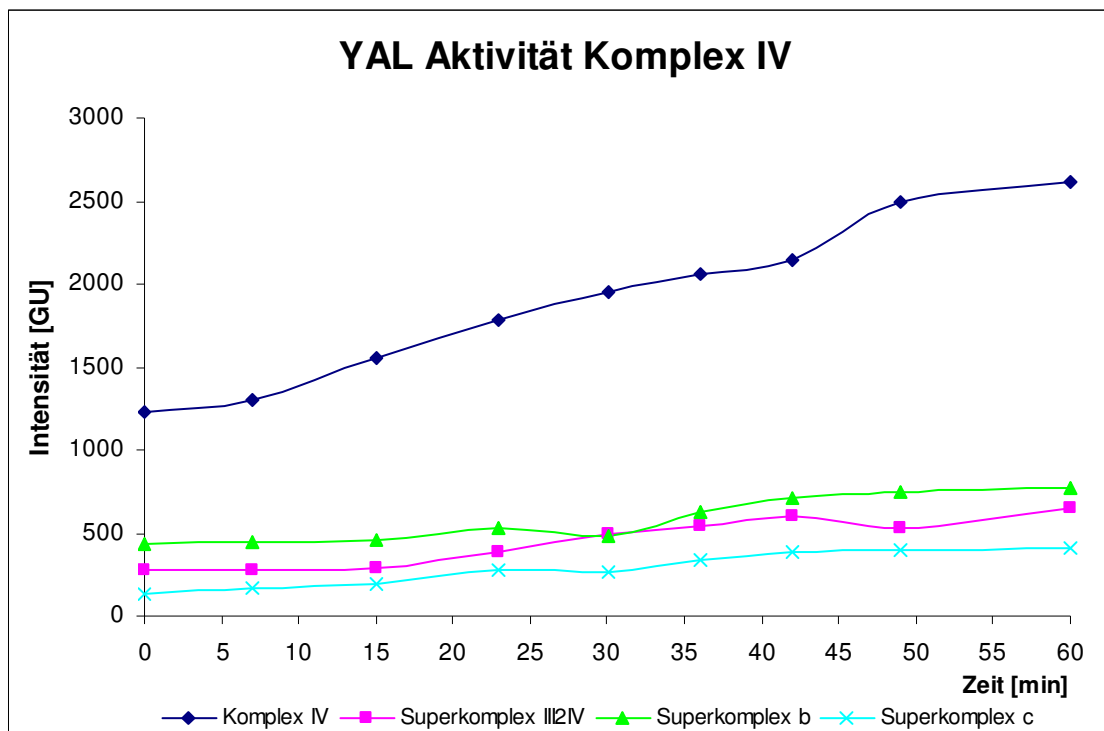
wässriger Lösung und einem damit verbundenen Herauswaschen des Coomassie-Farbstoffs nicht stattfinden und somit nicht in die Berechnungen der relativen spezifischen Aktivitäten miteinbezogen werden müssen.



**Abb. 5.31:** Zeitlicher Verlauf der Intensität der Referenzbande Superkomplex a (links) während des Aktivitätstests für Komplex IV der gepoolten interfibrillären Mitochondrien und Standardabweichung der ermittelten Intensitäten (rechts). Zu 9 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Bandenintensität in GU der Referenzbande bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Es ist deutlich erkennbar, dass während des Tests einige Änderungen in der Bandenintensität des Superkomplexes, jedoch keine Änderungen über die Zeit auftreten und damit Färbe- oder Entfärbe-Effekte des kompletten Gels bei der Bestimmung der Intensitäten der Aktivität zeigenden Banden nicht berücksichtigt werden müssen.

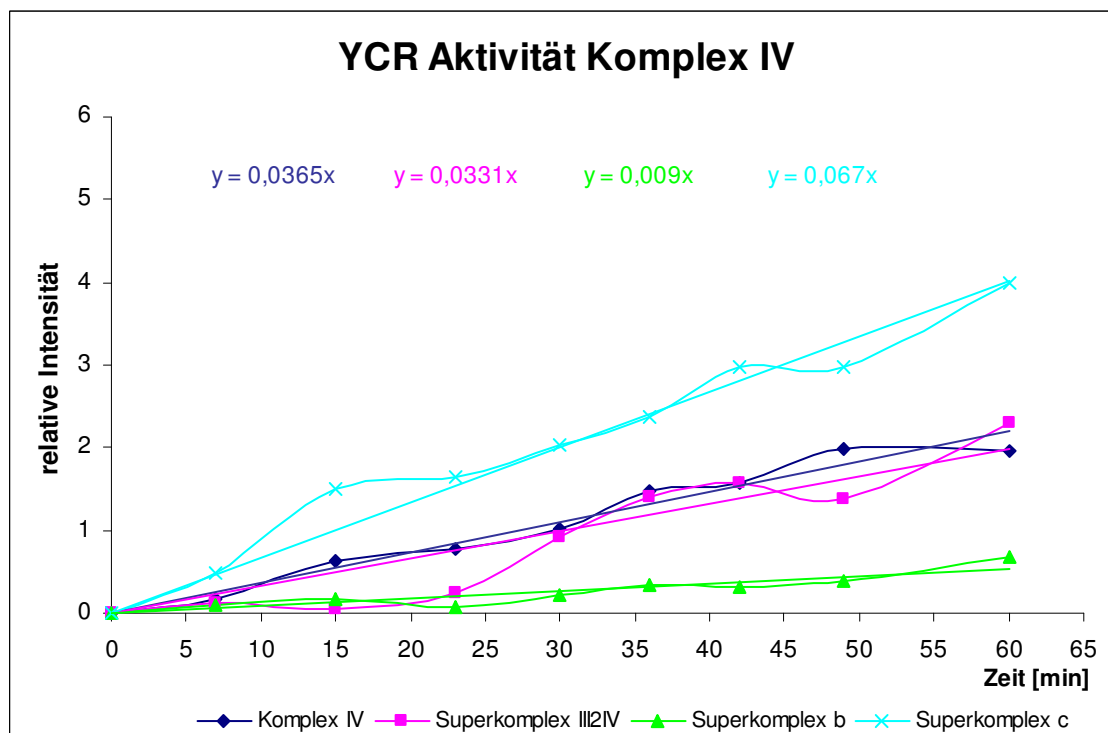
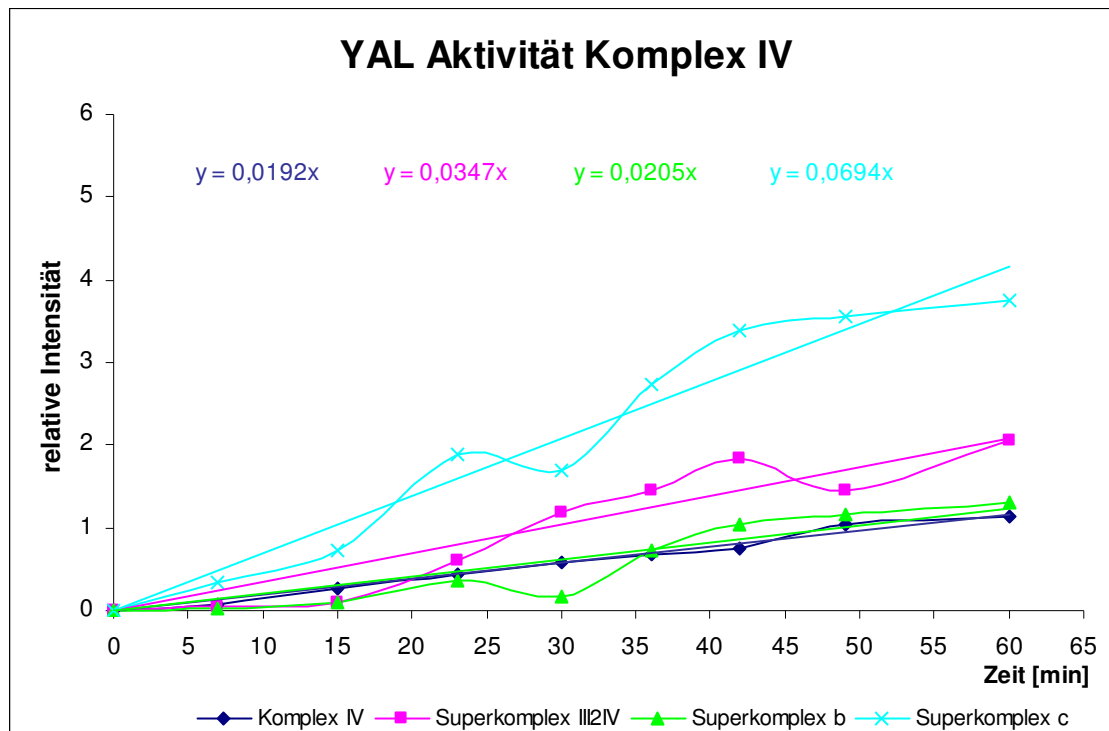
Der Intensitätsverlauf über die Zeit in Abbildung 5.32 lässt erkennen, dass Superkomplex b erst eine lange Plateauphase bis 30 min zeigt bevor sich ein Anstieg in der Intensität detektieren lässt. Dieser Umstand konnte bereits bei den subsarcolemmalen Mitochondrien im Aktivitätstest für Komplex IV (siehe Kapitel 5.4.1.2) gezeigt werden. Bei Komplex IV hingegen lässt sich der höchste Anstieg in der Intensität der untersuchten (Super-)Komplexe erkennen. Da es sich jedoch bei dieser Auftragung um die Absolutwerte handelt, können die hier klar ersichtlichen Tendenzen täuschen. Die Aktivität der Superkomplexe wird durch den Anteil von Komplex IV an diesem Superkomplex bestimmt. Daher ist es nötig, die in Abbildung 5.32 gezeigten Absolutwerte auf die Proteinmenge von Komplex IV im Superkomplex zu normieren. Da Komplex IV mit einer Größe von 200 kDa einen sehr kleinen Komplex darstellt, ist dementsprechend auch der Anteil an den untersuchten Superkomplexen gering. Bei einem Superkomplex b (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV) mit einer Masse von 1700 kDa beträgt der Anteil demnach nur 200/1700, also knapp ein Achtel. Wie sich dieser doch recht geringe Anteil auf die relative spezifische Aktivität auswirkt, zeigen die Abbildungen 5.33 und 5.34.



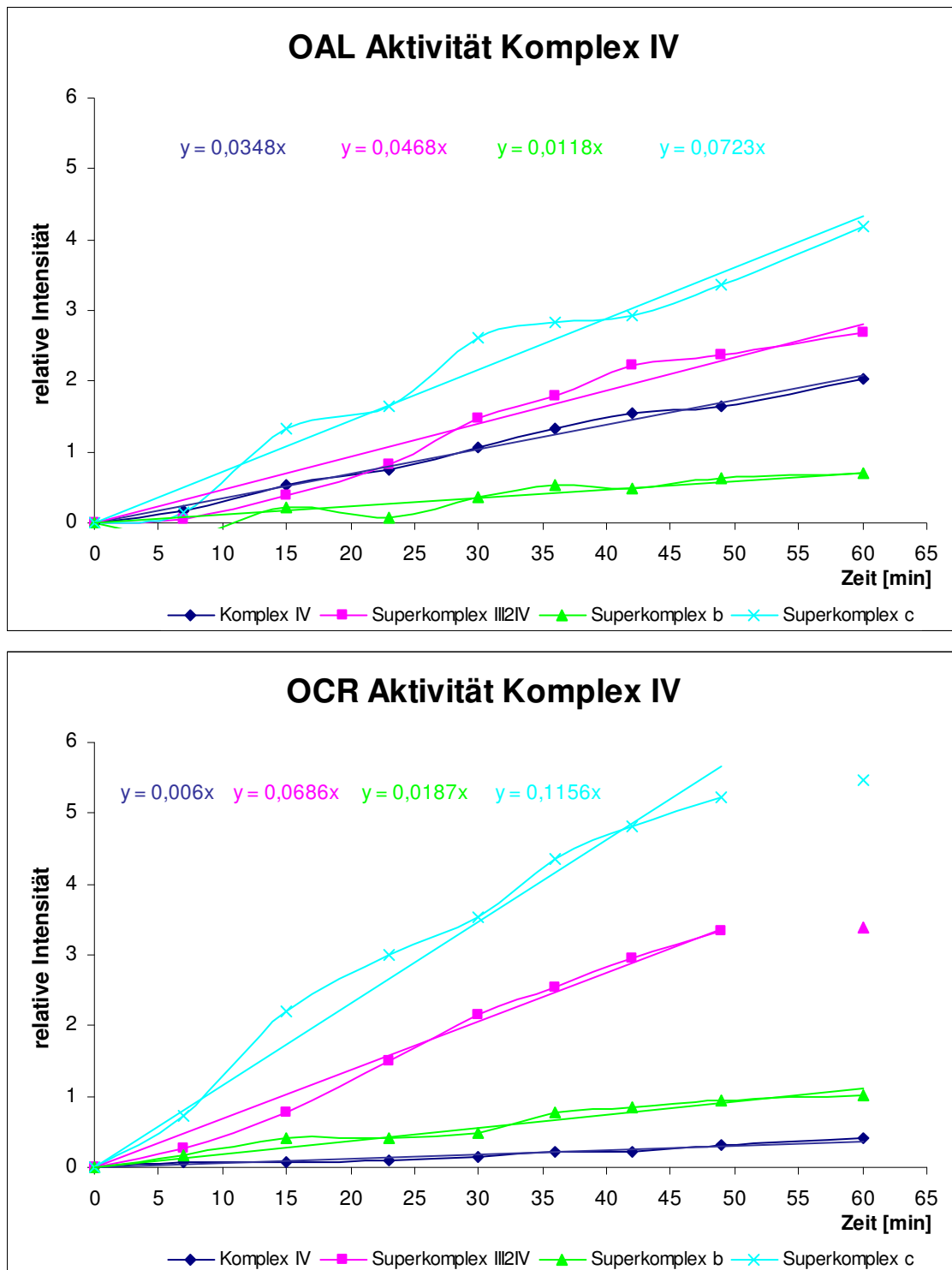


**Abb. 5.32:** Zeitlicher Verlauf der Bandenintensität während des Aktivitätstests für Komplex IV der gepoolten interfibrillären Mitochondrien. Zu 9 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Bandenintensität in GU von individuellem Komplex IV sowie der Superkomplexe III<sub>2</sub>IV, b (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>) und c (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>) ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Bei fast allen ausgewerteten Banden ist ein mehr oder minder linearer Aktivitätsverlauf zu erkennen, nur Superkomplex b zeigt erst nach etwa 30 min einen Intensitätszuwachs. Da diese ermittelten Intensitäten die Absolutwerte darstellen, kann anhand dieser Zeitkurve ausschließlich die Qualität des durchgeführten Aktivitätstests beurteilt werden, nicht aber die eigentliche Aktivität von Komplex IV als individueller Komplex oder in einem Superkomplex.

Die Steigungen der relativen spezifischen Aktivitäten über die Zeit, die aus den Diagrammen in den Abbildungen 5.33 und 5.34 ermittelt werden konnten, sind in Tabelle 5.6 und in Abbildung 5.35 zum besseren Vergleich dargestellt. Die dort aufgetragenen Steigungen wurden vorher mit dem Faktor 1000 multipliziert, um Werte unter 1 zu vermeiden. Die ermittelten Steigungen zeigen bei allen Gruppen die höchste Aktivität von Komplex IV in Superkomplex c. Für die Gruppen YAL, YCR und OAL zeigen sich kaum Unterschiede bei der Aktivität dieses Superkomplexes. OCR hingegen zeigt eine deutlich erhöhte Aktivität gegenüber den anderen 3 Gruppen. Die Aktivitätserhöhung für Superkomplex c liegt zwischen 60% im Vergleich mit OAL und 73% im Vergleich zu YCR. Ein ähnliches Bild zeigt sich für Superkomplex III<sub>2</sub>IV. Während die beiden Gruppen der jungen Tiere fast identische Steigungen aufweisen, zeigt die OAL-Gruppe eine Aktivitätserhöhung von knapp 40% gegenüber den jungen Gruppen. Die OCR-Gruppe weist sogar einen noch stärkeren Anstieg der relativen spezifischen Aktivität auf. Im Vergleich zu den Gruppen der jungen Individuen zeigt



**Abb. 5.33:** Relative spezifische Aktivitäten für Komplex IV der gepoolten interfibrillären Mitochondrien für die Gruppen YAL und YCR. Zu 9 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Aktivität relativ zur Proteinmenge in den Banden von individuellem Komplex IV sowie der Superkomplexe III<sub>2</sub>IV, b (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>) und c (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>) ermittelt, gegen die Zeit aufgetragen und die Steigungen bestimmt. Bei beiden Gruppen der jungen Tiere ist unabhängig von konventioneller Ernährung und Kalorienrestriktion zu erkennen, dass Superkomplex c die höchste relative spezifische Aktivität zeigt. Unterschiede in der Aktivität zwischen den beiden hier gezeigten Gruppen lassen sich nur für den individuellen Komplex IV und für Superkomplex b erkennen, während die Superkomplexe III<sub>2</sub>IV und c nahezu identische Aktivitäten zeigen.



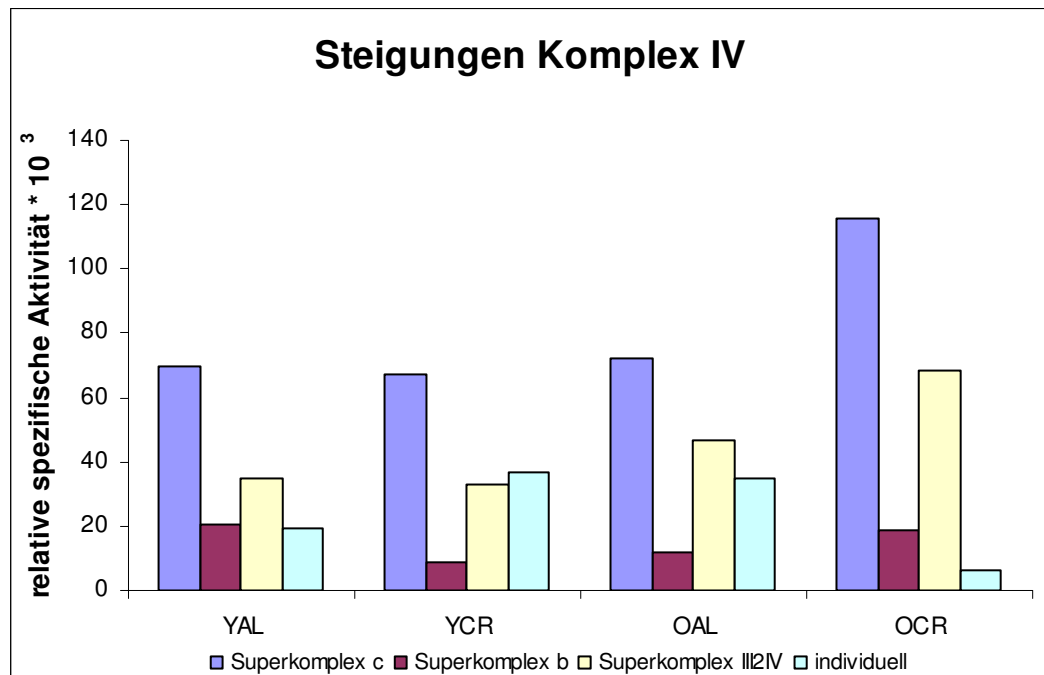
**Abb. 5.34:** Relative spezifische Aktivitäten für Komplex IV der gepoolten interfibrillären Mitochondrien für die Gruppen OAL und OCR. Zu 9 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Aktivität relativ zur Proteinmenge in den Banden von individuellem Komplex IV sowie der Superkomplexe III<sub>2</sub>IV, b (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>) und c (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>) ermittelt, gegen die Zeit aufgetragen und die Steigungen bestimmt. Bei beiden Gruppen der alten Tiere ist unabhängig von konventioneller Ernährung und Kalorienrestriktion zu erkennen, dass Superkomplex c die höchste relative spezifische Aktivität zeigt. Für die OCR-Gruppe konnte für alle Superkomplexe eine höhere Aktivität gemessen werden als für die OAL-Gruppe.

die OCR-Gruppe eine doppelt so hohe Aktivität, im Vergleich zu OAL ist immerhin noch ein Anstieg von 47% zu verzeichnen. Bei den beiden jungen Gruppen ist keine klare Tendenz erkennbar, inwiefern eine Kalorienrestriktion die Aktivität von Komplex IV beeinflusst. Die Superkomplexe III<sub>2</sub>IV und c zeigen bei den beiden Gruppen so gut wie keine Unterschiede mit minimalen Änderungen von unter 5%. Der individuelle Komplex IV zeigt hingegen einen deutlichen CR-bedingten Anstieg der relativen spezifischen Aktivität von 90%, während bei Superkomplex b eine deutliche Abnahme von 56% zu erkennen ist. Bei den beiden Gruppen der alten Individuen zeigt sich wie schon erwähnt eine deutliche CR-bedingte Aktivitätszunahme für die Superkomplexe. Für individuellen Komplex IV hingegen konnte eine extrem starke Abnahme von 83% detektiert werden. Auch die alternsbedingten Änderungen bei den normal gefütterten Tieren zeigen ein uneinheitliches Bild. Während sich für Superkomplex c nur eine minimale Zunahme erkennen lässt, zeigt Superkomplex b eine deutliche Abnahme von 42%. Sowohl für den individuellen Komplex IV als auch für Superkomplex III<sub>2</sub>IV können teils deutliche Zunahmen von 81% und 35% detektiert werden. Für die beiden Gruppen mit Kalorienrestriktion zeigen sich bei den Superkomplexen deutliche alternsbedingte Zunahmen der relativen spezifischen Aktivität. Bei den Superkomplexen III<sub>2</sub>IV und b beträgt die Aktivität in der OCR-Gruppe knapp das Doppelte im Vergleich zur YCR-Gruppe, während die Zunahme der Aktivität für Superkomplex c immerhin noch 73% beträgt.

**Tab. 5.6:** Steigungen der Regressionsgeraden der relativen spezifischen Aktivität von Komplex IV aus interfibrillären Mitochondrien für die vier untersuchten Gruppen, multipliziert mit 10<sup>3</sup>.

	Steigungen der Regressionsgeraden [ $\text{min}^{-1} \cdot 10^3$ ]			
	YAL	YCR	OAL	OCR
<b>Superkomplex c</b>	69,4	67,0	72,3	115,6
<b>Superkomplex b</b>	20,5	9,0	11,8	18,7
<b>Superkomplex III<sub>2</sub>IV</b>	34,7	33,1	46,8	68,6
<b>individueller Komplex IV</b>	19,2	36,5	34,8	6,0

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich bei allen untersuchten Proben für Superkomplex c mit Abstand die höchste relative spezifische Aktivität der untersuchten (Super-)Komplexe detektieren lässt. Bis auf die OCR-Gruppe zeigte Superkomplex c bei allen anderen Gruppen kaum Unterschiede in der Aktivität. Des Weiteren zeigt sich bezüglich Alterns- oder Kalorienrestriktionseffekten ein sehr uneinheitliches Bild. Es ist beim Vergleich der Proben keine klare Tendenz erkennbar. Generell lässt sich allerdings sagen, dass der individuelle Komplex IV prozentual gesehen die deutlichsten Veränderungen aufweist.



**Abb. 5.35:** Steigungen der Regressionsgeraden der relativen spezifischen Aktivität von Komplex I aus interfibrillären Mitochondrien für die vier untersuchten Gruppen, multipliziert mit  $10^3$ . Für alle Gruppen zeigt Superkomplex c mit Abstand die größten Steigungen und damit die höchste Aktivität.

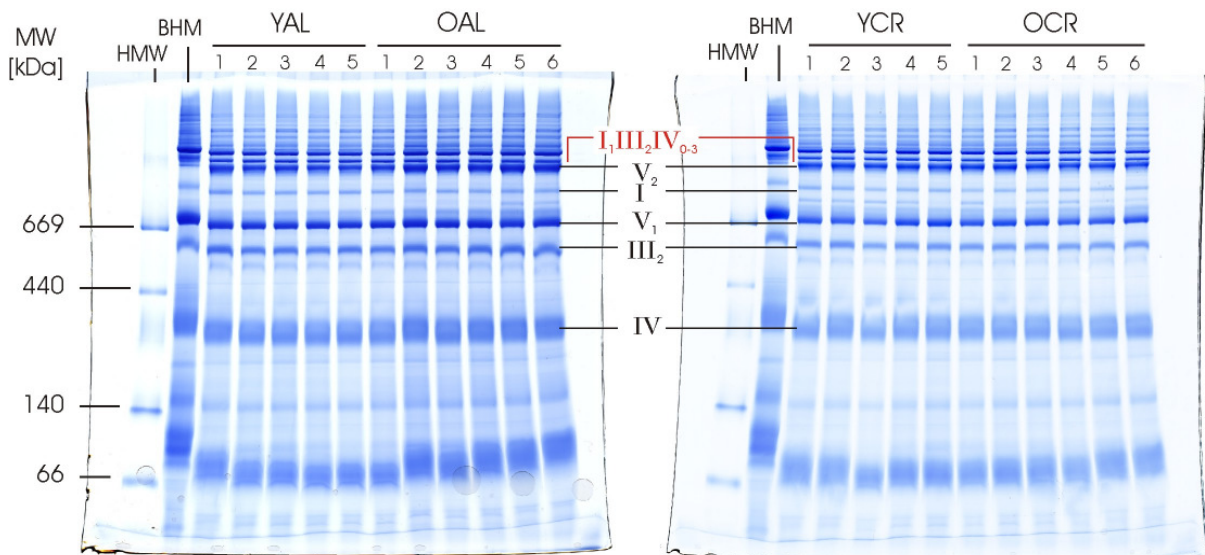
## 5.5 Quantitative Analyse des mitochondrialen Proteoms

### 5.5.1 Subsarcolemmale Mitochondrien aus Herz

In dieser Arbeit wurden für die im Folgenden gezeigte Proteomanalyse von jeder Herzprobe jeweils zwei 2D-BN/SDS-Gele hergestellt. Für die beiden Gruppen der jungen Tiere standen je 5 Individuen zur Verfügung, für die Gruppen der alten Tiere betrug die Probenanzahl jeweils 6 Individuen, die alle einzeln in Abbildung 5.36 in BN-Gelen gezeigt sind. Die in diesem Kapitel gezeigten Daten der quantitativen Proteomanalyse basieren demnach auf einer Anzahl von 44 2D-BN/SDS-Gelen. Die in den folgenden Diagrammen angegebenen Intensitäten in Grauwerten (GU) sind ein direktes Maß für die Menge und können direkt miteinander verglichen werden.

Die untersuchten Proteinspots auf den 2D-Gelen wurden aufgrund von verschiedenen MALDI-Analysen mittels PMF (peptide mass fingerprinting) in der Arbeitsgruppe Dencher identifiziert und konnten so den dazugehörigen Proteinkomplexen zugeordnet werden. Der Großteil dieser Proteine und Proteinuntereinheiten wurde von Reifschneider<sup>[93, 110]</sup> identifiziert. Zudem dienen das in der Arbeitsgruppe sehr gut charakterisierte Rinderherz und *In-Gel*-Aktivitätstests der untersuchten Proben als Hilfe bei der Zuordnung von Komplexen und deren Superkomplexen.

Die Probenanzahl von 5 bzw. 6 Individuen pro Gruppe lässt eine statistische Analyse der Daten zu, deren Resultate jeweils in die nachfolgenden Diagramme integriert sind. Als statistische Methode wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-Test<sup>[111, 112]</sup> gewählt.



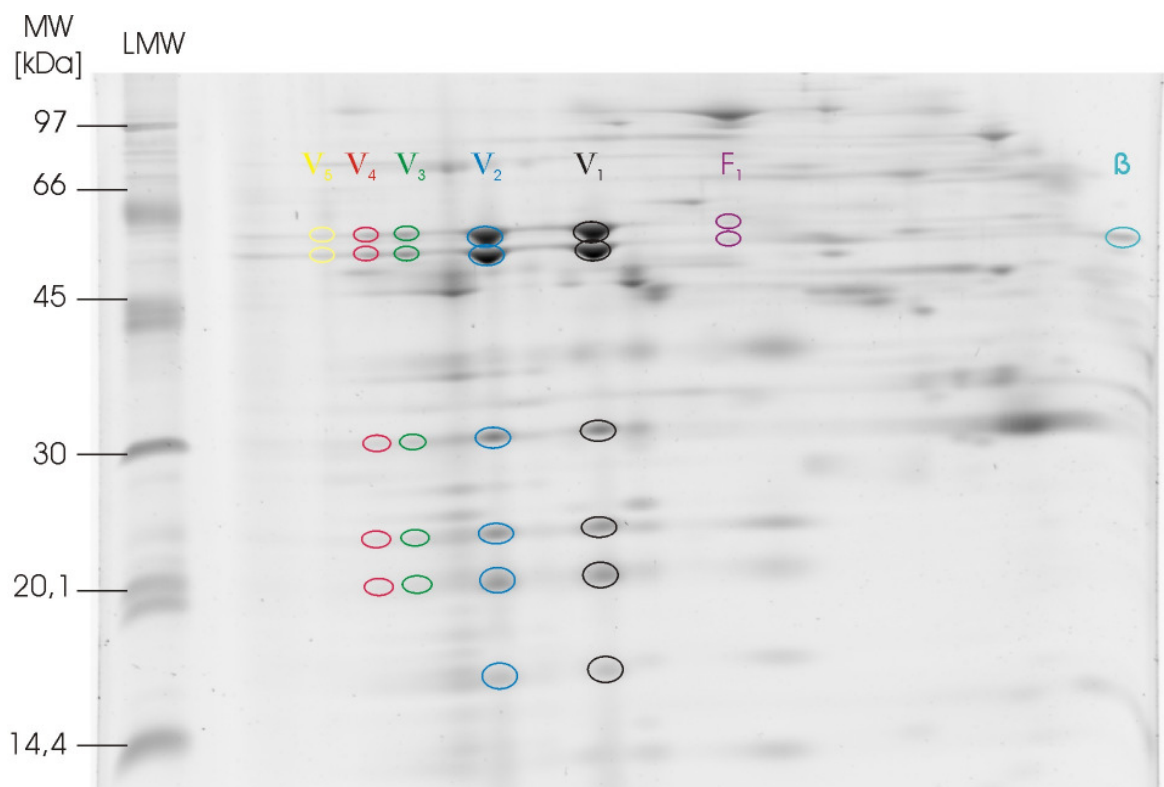
**Abb. 5.36:** BN-Gele der subsarcolemmalen Mitochondrien aller 22 untersuchten Proben. Die Mitochondrien wurden mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 4g/g solubilisiert. Pro Spur wurden 80 µg Protein vor Solubilisierung aufgetragen. Individuelle Komplexe sind in schwarz dargestellt, Superkomplexe in rot.

#### 5.5.1.1 ATP-Synthase

Die  $F_0F_1$ -ATP-Synthase, auch Komplex V der oxidativen Phosphorylierung genannt, ist die Hauptquelle der Synthese von ATP in jedem Organismus. Sie kommt sowohl in Prokaryonten in der Zellmembran vor, als auch in Eukaryonten, bei denen diese in der inneren Membran der Mitochondrien und in der Thylakoidmembran der pflanzlichen Zellen zu finden sind. Den durch Komplex I bis IV generierten elektrochemischen Protonengradient nutzt die ATP-Synthase als Energie, indem über einen Protoneneinstrom durch die Membran in das Cytoplasma der membranständige  $F_0$ -Teil wie eine Turbine angetrieben wird und diese Energie zur elektrochemischen Synthese von ATP im  $F_1$ -Teil des Enzyms genutzt wird. Es ist mittlerweile bekannt, dass die ATP-Synthase nicht nur als monomerer Enzymkomplex vorliegen kann, sondern in einer Vielzahl von Organismen ebenfalls als Dimer oder sogar in größeren Oligomeren zu finden ist<sup>[113-117]</sup>. Des Weiteren konnten zusätzlich zu den homooligomeren Formen der ATP-Synthase Teilstücke dieser nachgewiesen werden. So wurde beispielsweise in unterschiedlichen Geweben häufig der freie  $F_1$ -Teil, also die Kopfgruppe des ATP-Synthase-Komplexes, nachgewiesen<sup>[91, 93, 103, 104]</sup> und Reifschneider<sup>[93]</sup>

konnte sogar freie  $\beta$ -Untereinheiten in 2D-Gelen mittels MALDI-MS identifizieren. Die ATP-Synthase hat in ihrer monomeren Form eine Masse von 750 kDa.

In den subsarcolemmalen Mitochondrien aus Rattenherz, die in dieser Arbeit untersucht wurden, kann die ATP-Synthase sowohl in monomerer Form als auch in Oligomeren bis hin zum Pentamer detektiert werden. Des Weiteren kann sowohl freier  $F_1$ -Teil als auch freie  $\beta$ -Untereinheit gefunden und quantifiziert werden. Für alle Formen der ATP-Synthase inkl. des freien  $F_1$ -Teils können die größten und auf den 2D-Gelen prägnantesten Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  quantifiziert werden. Zusätzlich werden für das Monomer und das Dimer fünf weitere Proteinspots als Untereinheiten der ATP-Synthase gefunden und ebenfalls quantifiziert. Für das Trimer und das Tetramer kann der Proteinspot mit der kleinsten Masse, der die beiden Untereinheiten i und e enthält, aufgrund der geringeren Menge nicht mehr detektiert werden. Die Lage der quantifizierten Untereinheiten der ATP-Synthase in den in dieser Arbeit hergestellten 2D-Gelen ist in Abbildung 5.37 gezeigt.



**Abb. 5.37:** Ausschnitt eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO<sup>®</sup> Ruby gefärbten 2D-Gels der untersuchten subsarcolemmalen Mitochondrien aus Rattenherz. Die markierten Proteinspots zeigen Untereinheiten der ATP-Synthase, die neben dem Monomer (schwarz) auch in den oligomeren Formen Dimer (blau), Trimer (grün), Tetramer (rot) und Pentamer (gelb) in den hergestellten 2D-Gelen detektiert werden kann. Darüber hinaus können sowohl der freie  $F_1$ -Teil der ATP-Synthase (lila) als auch freie  $\beta$ -Untereinheit (türkis) gefunden werden.



---

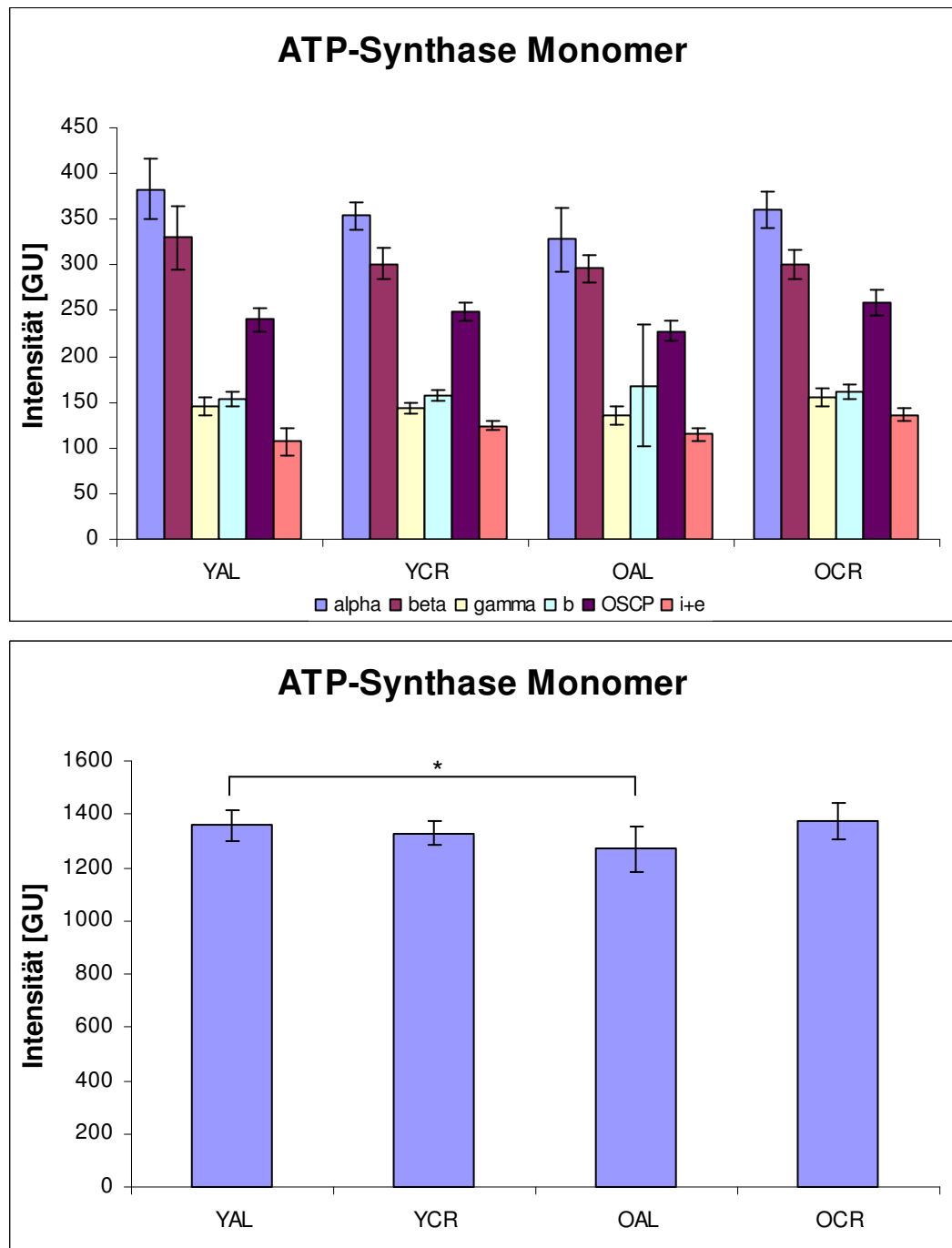
Dem Monomer und dem Dimer der ATP-Synthase konnten jeweils sechs Proteinspots zugeordnet werden, wobei der Spot mit der geringsten molekularen Masse zwei verschiedene Untereinheiten der ATP-Synthase enthält. Hierbei handelt es sich um die Untereinheiten i und e<sup>[93, 110]</sup>.

Die detektierbaren Untereinheiten beim Monomer der ATP-Synthase zeigen, wie in Abbildung 5.38 zu sehen ist, eine gleiche stöchiometrische Verteilung bei allen Gruppen unabhängig vom Alter und der Ernährung. Da sich die Untereinheiten aufgrund der Datenmenge einzeln allerdings nur schwer miteinander vergleichen lassen, werden diese für eine übersichtlichere Darstellungsform aufaddiert. Hierbei ist sehr deutlich zu erkennen, dass es bei der Menge des ATP-Synthase-Monomers nur geringfügige nicht-signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gibt. Die Werte liegen zwischen 1270 GU für die OAL-Gruppe und 1372 GU für die OCR-Gruppe. Die einzige signifikante Änderung in der Proteinmenge zeigt sich in der alternsbedingten Abnahme von 6% bei den *ad libitum* gefütterten Tieren.

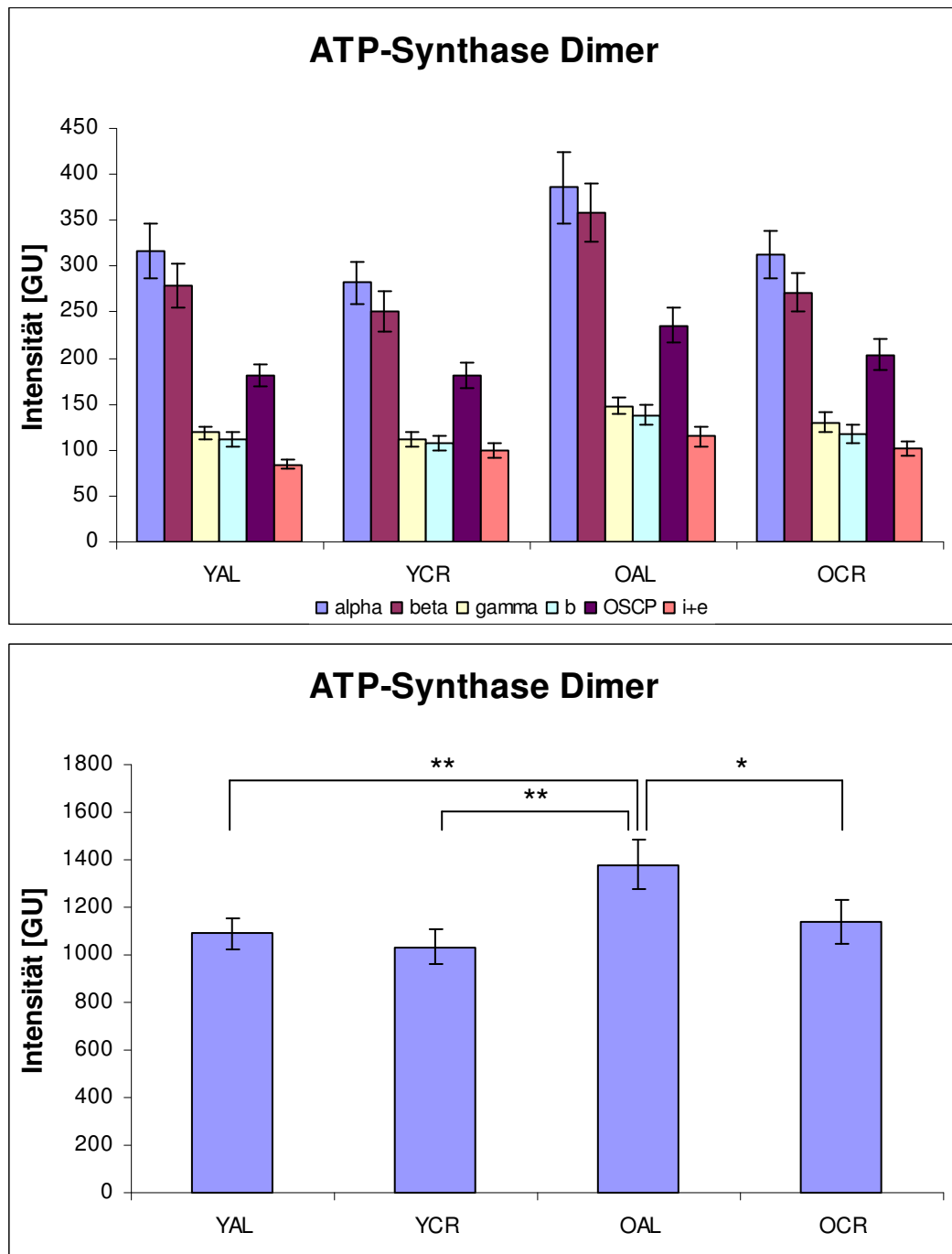
Ein ähnliches Bild, allerdings mit entgegengesetzter Tendenz, ist für das Dimer der ATP-Synthase in Abbildung 5.39 zu sehen. Drei der vier Gruppen zeigen so gut wie keine Änderung in der Proteinmenge, jedoch sticht die OAL-Gruppe mit einer deutlichen Zunahme im Vergleich zu allen anderen Gruppen deutlich heraus. Es handelt sich hierbei mit einem Wert von 1381 GU um eine signifikante Erhöhung der Proteinmenge von 27% und 34% im Vergleich zu den jungen Gruppen ohne und mit Kalorienrestriktion und 21% gegenüber der OCR-Gruppe. Die Werte der drei anderen Gruppen schwanken nur leicht zwischen 1033 GU (YCR) und 1137 GU (OCR).

Die detektierte Erhöhung der Menge des Dimers bei der OAL-Gruppe schlägt sich ebenfalls in einer deutlichen Änderung des Verhältnisses von Monomer zu Dimer der ATP-Synthase nieder, das in Abbildung 5.40 dargestellt ist. Ein Wert von <1 bedeutet, dass das Verhältnis zugunsten des Dimers verschoben ist und damit in einer größeren Menge vorliegt als das Monomer. Dieser Fall ist für die OAL-Gruppe deutlich zu erkennen. Während die anderen drei Gruppen mit Verhältnissen von 1,21 für YAL, 1,26 für YCR und 1,16 für OCR sehr ähnliche Werte zugunsten des Monomers aufweisen, zeigt die OAL-Gruppe einen Wert von 0,86. Diese Verschiebung des Verhältnisses beruht zum kleinen Teil auf einer minimal geringeren Menge des Monomers mit maximal 6% weniger im Vergleich zu den anderen Gruppen (siehe Abbildung 5.38), zum großen Teil jedoch auf der sehr deutlichen Mengenzunahme des Dimers zwischen 21% und 34% (siehe Abbildung 5.39). Bisher ist leider noch nicht bekannt, ob eine der beiden Formen eine höhere Aktivität aufweist.

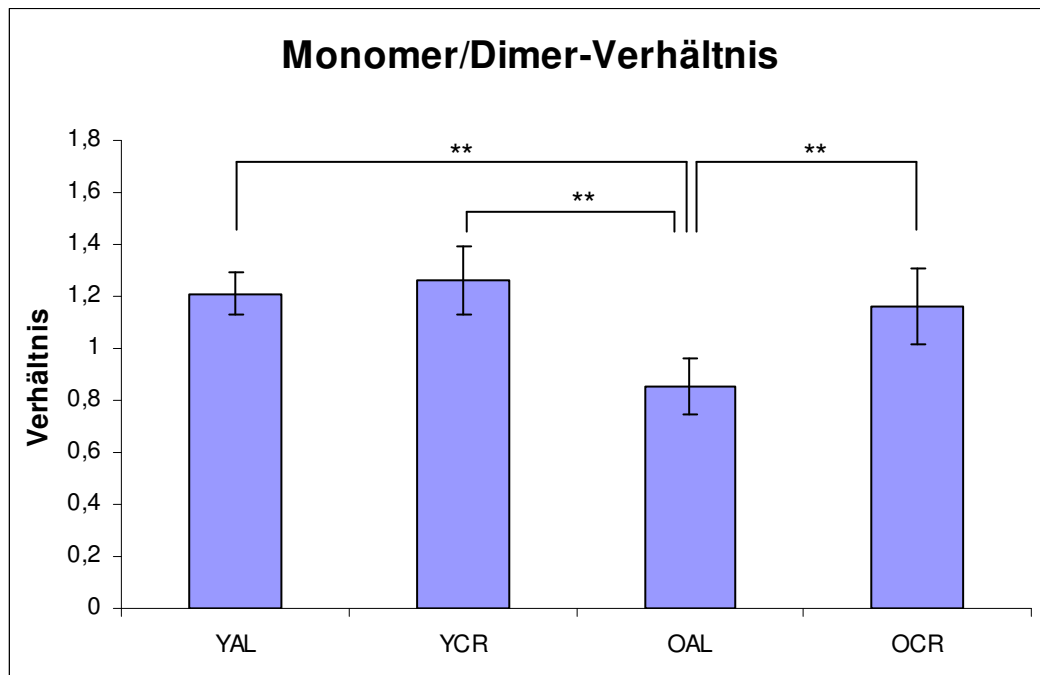




**Abb. 5.38:** Gesamtmenge des Monomers der ATP-Synthase aus subsarcolemmalen Mitochondrien, aufgeteilt in detektierbare Untereinheiten (oben) und deren Summe (unten). Es zeigt sich unabhängig von Alter oder Kalorienrestriktion eine vergleichbare stöchiometrische Verteilung der untersuchten Untereinheiten. Die aufsummierten Untereinheiten zeigen kaum Änderungen, einzig bei den *ad libitum* gefütterten Ratten (YAL und OAL) konnte eine signifikante altersbedingte Abnahme von 6% in der Menge des ATP-Synthase Monomers detektiert werden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei n = 5 für die jungen und n = 6 für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 )

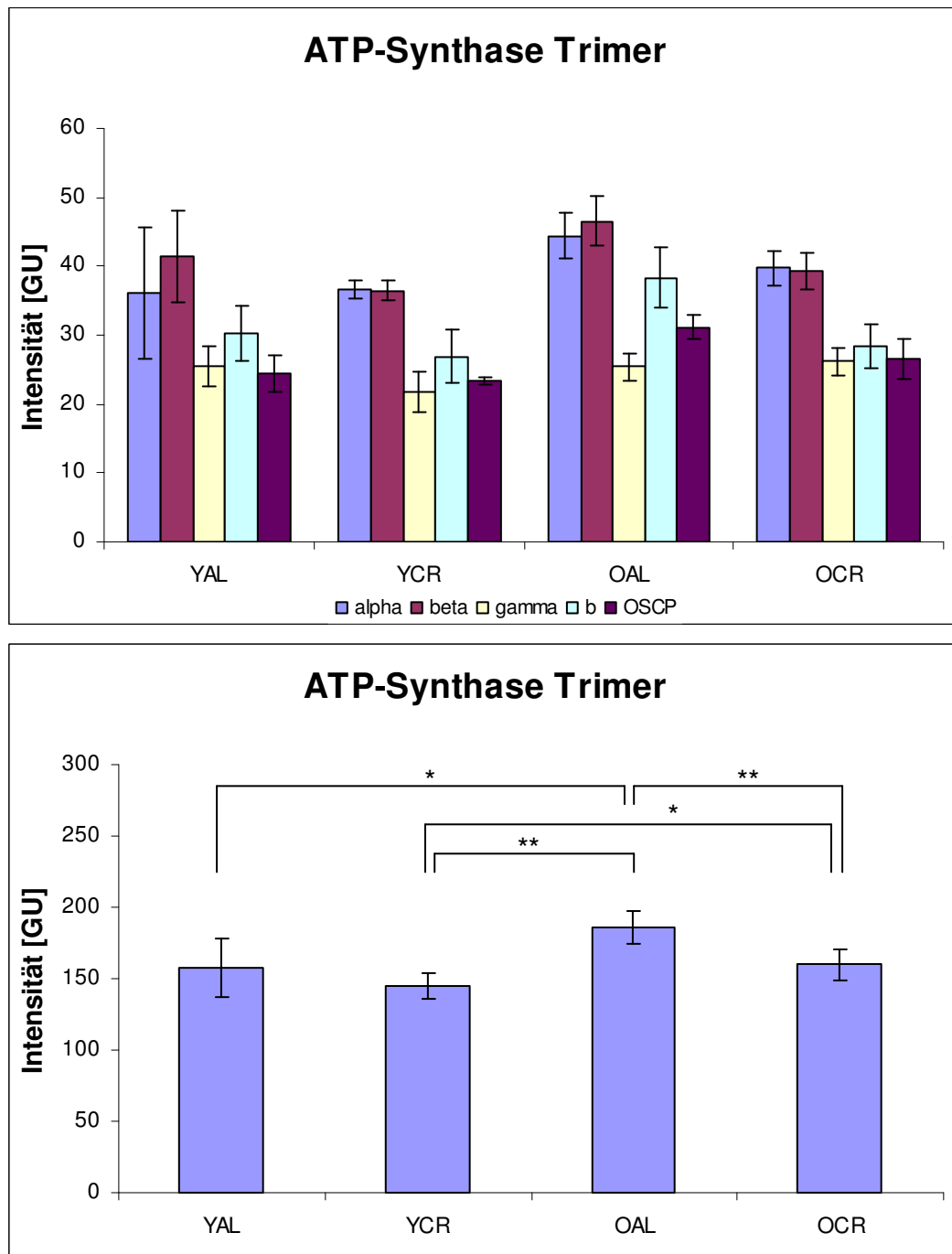


**Abb. 5.39:** Gesamtmenge des Dimers der ATP-Synthase aus subsarcolemmalen Mitochondrien, aufgeteilt in detektierbare Untereinheiten (oben) und deren Summe (unten). Es zeigt sich unabhängig von Alter oder Kalorienrestriktion eine vergleichbare stöchiometrische Verteilung der untersuchten Untereinheiten. Die aufsummierten Untereinheiten zeigen kaum Änderungen, einzig für die Gruppe der alten *ad libitum* gefütterten Ratten (OAL) konnte eine statistisch signifikante Zunahme in der Menge des ATP-Synthase Dimers im Vergleich zu allen anderen Gruppen detektiert werden. Diese signifikanten Zunahmen liegen bei 27% und 34% im Vergleich zu den jungen Gruppen (YAL und YCR) und bei 21% gegenüber der Gruppe der alten Individuen mit Kalorienrestriktion (OCR). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )



**Abb. 5.40:** Verhältnis von Monomer zu Dimer der ATP-Synthase aus subsarcolemmalen Mitochondrien. Es zeigen sich für fast alle Gruppen kaum Änderungen mit geringen Schwankungen um einen Wert von ca. 1,2. Die Gruppe der alten *ad libitum* gefütterten Tiere (OAL) zeigt hingegen im Vergleich zu den anderen Gruppen mit einem Wert von 0,86 eine Verschiebung des Verhältnisses zugunsten des Dimers. Diese Verschiebung beruht auf der deutlich erhöhten Menge des Dimers dieser Gruppe, während das Monomers eine nur minimale Abnahme im Vergleich zu den anderen Gruppen aufweist. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

Von den oligomeren Formen der ATP-Synthase können weniger Untereinheiten detektiert werden als für das Monomer und das Dimer. Dies liegt an der deutlich reduzierten Menge der oligomeren Formen. Die beiden Untereinheiten mit den größten und prägnantesten Spots sind die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des  $F_1$ -Teils der ATP-Synthase. Diese besitzen nicht nur mit je über 50 kDa die höchste molekulare Masse aller ATP-Synthase-Untereinheiten, sondern sind auch mit jeweils 3 Kopien pro Enzymkomplex häufiger vertreten als alle anderen Untereinheiten mit Ausnahme der c-Untereinheit, was zu einer im Vergleich vermehrten Bindung des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs führt. Während sowohl für das Monomer als auch für das Dimer noch sechs Proteinspots in den 2D-Gelen der ATP-Synthase zugeordnet werden können, reduziert sich diese Zahl bei den Trimeren und Tetrameren auf fünf, bei den Pentameren sogar nur noch auf zwei, wobei es sich hierbei um  $\alpha$  und  $\beta$  handelt. Während sich bei Monomer und Dimer die ermittelten Intensitäten der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten auf Werte von 250 bis 400 GU belaufen, liegen diese für das Trimer und das Tetramer (Abbildungen 5.41 und 5.42) bei maximal 50 GU, für das Pentamer sogar nur bis etwa 20 GU. Mit abnehmender Intensität sind demnach die kleinste (bei Trimer und Tetramer) bzw. die kleineren Untereinheiten als  $\alpha$  und  $\beta$  (bei Pentamer) nicht mehr detektierbar.



**Abb. 5.41:** Gesamtmenge des Trimers der ATP-Synthase aus subsarcolemmalen Mitochondrien, aufgeteilt in detektierbare Untereinheiten (oben) und deren Summe (unten). Es zeigt sich unabhängig von Alter oder Kalorienrestriktion eine vergleichbare stöchiometrische Verteilung der untersuchten Untereinheiten. Die aufsummierten Untereinheiten zeigen unabhängig von der Ernährungsweise einen signifikanten altersbedingten Anstieg in der Menge. Des Weiteren konnte eine CR-bedingte Abnahme unabhängig vom Alter detektiert werden, wobei ausschließlich die bei den alten Individuen beobachtete Änderung signifikant ist.

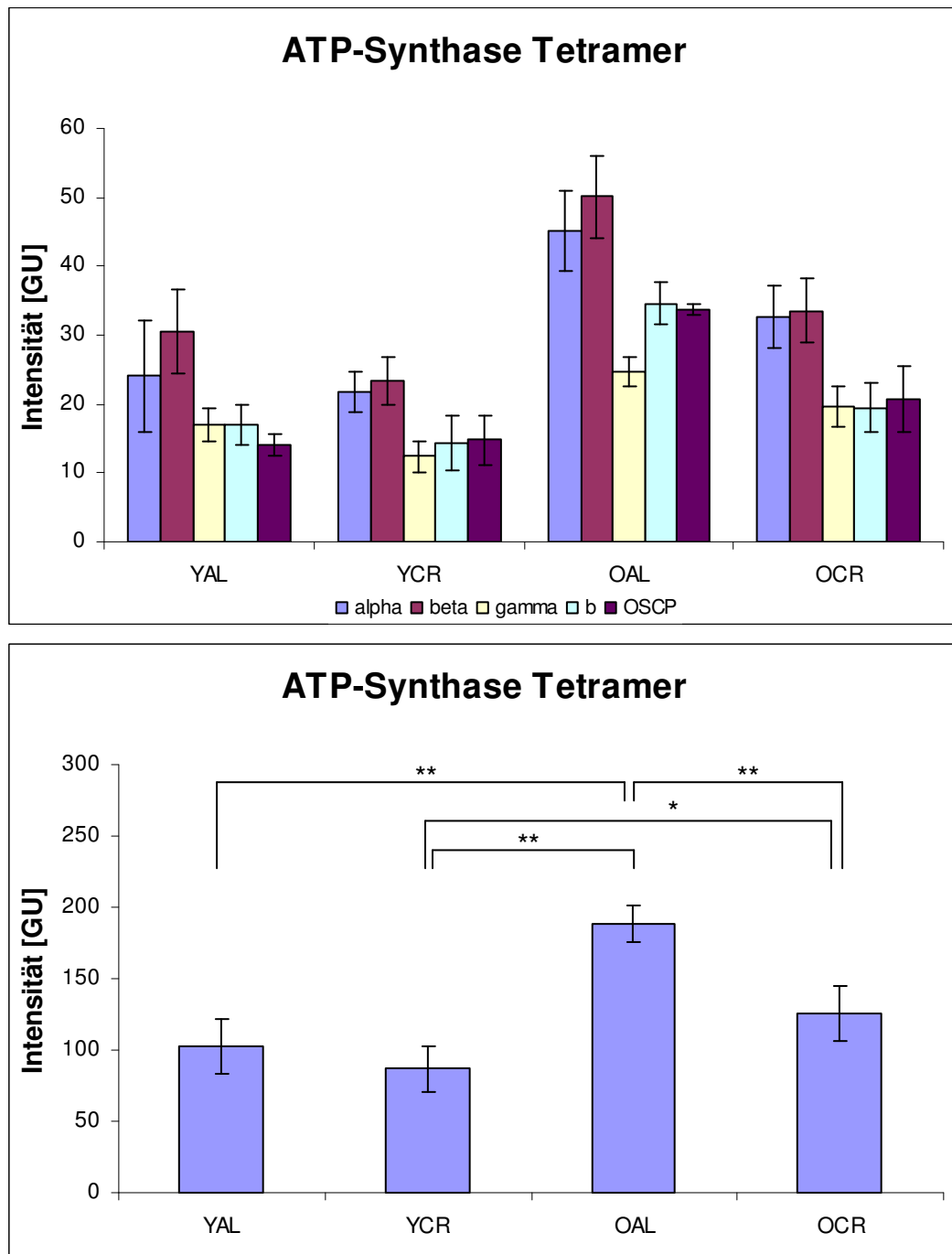
Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

---

Das Trimer der ATP-Synthase, dessen Intensitäten der einzelnen Untereinheiten und deren Summe in den Diagrammen der Abbildung 5.41 dargestellt sind, zeigt eine leichte, aber signifikante Mengenzunahme mit dem Alter unabhängig von ihrem Ernährungsstatus. Für die *ad libitum* gefütterten Tiere kann ein Anstieg von 18% mit dem Alter beobachtet werden, für die der Kalorienrestriktion unterzogenen Tiere sind es noch 10%. Gleichzeitig zeigt sich eine minimale CR-bedingte Abnahme in der Menge des ATP-Synthase-Trimers, die unabhängig vom Alter sowohl bei den jungen als auch bei den alten Tieren zu finden ist. Diese Änderungen sind mit 8% für die jungen Tiere und 14% für die alten Individuen zwar sehr klein, jedoch ist zumindest die CR-bedingte Abnahme bei den alten Individuen signifikant mit einem  $p$ -Wert von unter 0,01.

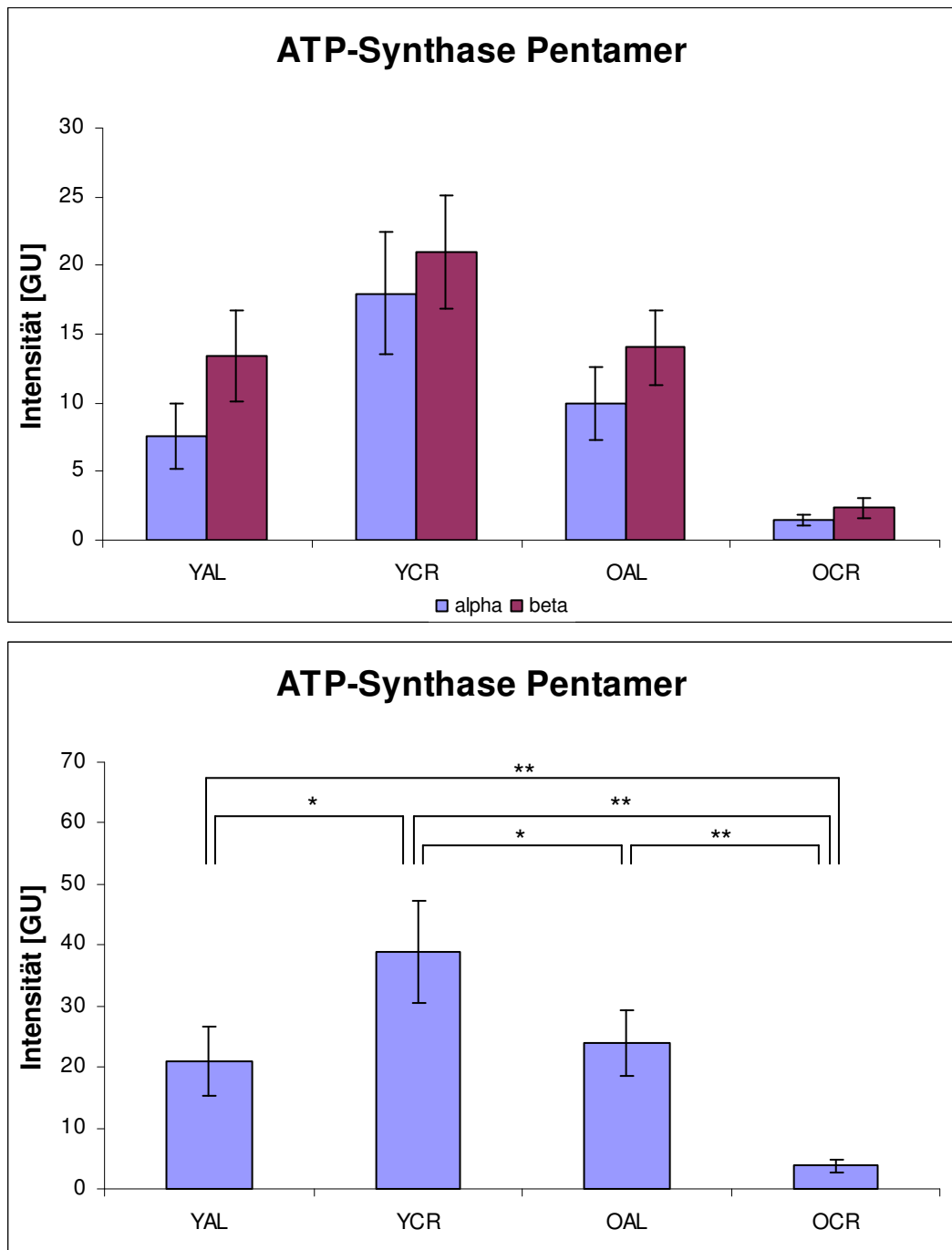
Für das Tetramer der ATP-Synthase, dessen Intensitäten der einzelnen Untereinheiten und deren Summe in den Diagrammen der Abbildung 5.42 dargestellt sind, kann die gleiche Tendenz der alters- und ernährungsbedingten Änderungen wie bei dem Trimer detektiert werden. Die Gruppe der alten *ad libitum* gefütterten Tiere zeigt im Vergleich zu den anderen drei Gruppen mit Abstand die größte Menge an Tetrameren der ATP-Synthase. Im Vergleich zur YCR-Gruppe, die den niedrigsten Wert aufweist, besitzen die Tiere der OAL-Gruppe im Mittel etwas mehr als die doppelte Menge an Tetramer. Diese große Mengenzunahme ist im direkten Vergleich mit jeder anderen untersuchten Gruppe deutlich signifikant mit  $p$ -Werten von unter 0,01. Die altersbedingte Mengenzunahme beträgt für die *ad libitum* gefütterten Tiere 84%, während für die beiden Gruppen mit Kalorienrestriktion eine ebenfalls signifikante Zunahme von 45% beobachtet werden kann. Neben der altersbedingten Zunahme in der Menge des Tetramers der ATP-Synthase kann ebenfalls eine CR-bedingte Abnahme für die Gruppen des gleichen Alters detektiert werden. Bei den beiden Gruppen der jungen Tiere beträgt die Abnahme 16%, die allerdings aufgrund der etwas höheren Standardabweichungen von jeweils knapp unter 20% der Absolutwerte nicht signifikant ist. Im Gegensatz dazu ist die CR-bedingte Mengenabnahme bei den alten Tieren mit 33% nicht nur doppelt so hoch wie bei den jungen Tieren, sondern auch mit einem  $p$ -Wert von unter 0,01 signifikant.

Beim Vergleich der Mengen von Tri- und Tetramer fällt besonders auf, dass bei fast allen Gruppen das Tetramer Werte von nur etwa zwei Dritteln der Intensität zeigen wie für das Trimer. Diese Tendenz ist einzig für die OAL-Gruppe nicht zu beobachten. Hier liegen die Werte für das Trimer bei 186 GU und für das Tetramer bei 188 GU. Damit ist für die Gruppe der alten *ad libitum* gefütterten Tiere gegen die Tendenz, die alle anderen Gruppen zeigen, quasi keine Änderung in der Menge zwischen Trimer und Tetramer zu beobachten.



**Abb. 5.42:** Gesamtmenge des Tetramers der ATP-Synthase aus subsarcolemmalen Mitochondrien, aufgeteilt in detektierbare Untereinheiten (oben) und deren Summe (unten). Es zeigt sich unabhängig von Alter oder Kalorienrestriktion eine vergleichbare stöchiometrische Verteilung der untersuchten Untereinheiten. Die aufsummierten Untereinheiten zeigen unabhängig von der Ernährungsweise einen signifikanten altersbedingten Anstieg in der Menge des Tetramers der ATP-Synthase von bis zu 84% bei den *ad libitum* gefütterten Tieren. Des Weiteren konnte eine CR-bedingte Abnahme unabhängig vom Alter detektiert werden, wobei ausschließlich die bei den alten Individuen beobachtete Abnahme von 33% signifikant ist.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )



**Abb. 5.43:** Gesamtmenge des Pentamers der ATP-Synthase aus subsarcolemmalen Mitochondrien, aufgeteilt in detektierbare Untereinheiten (oben) und deren Summe (unten). Es zeigt sich unabhängig von Alter oder Kalorienrestriktion eine vergleichbare stöchiometrische Verteilung der beiden untersuchten Untereinheiten. Die aufsummierten Werte zeigen für die *ad libitum* gefütterten Tiere mit dem Altern eine minimale Zunahme, die jedoch nicht signifikant ist. Für die jungen Tiere zeigt sich bei einer Kalorienrestriktion ein signifikanter Anstieg in der Menge von 86% während für die beiden Gruppen der alten Tiere eine deutliche Mengenabnahme von 84% mit applizierter Kalorienrestriktion detektiert werden konnte.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei n = 5 für die jungen und n = 6 für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 )

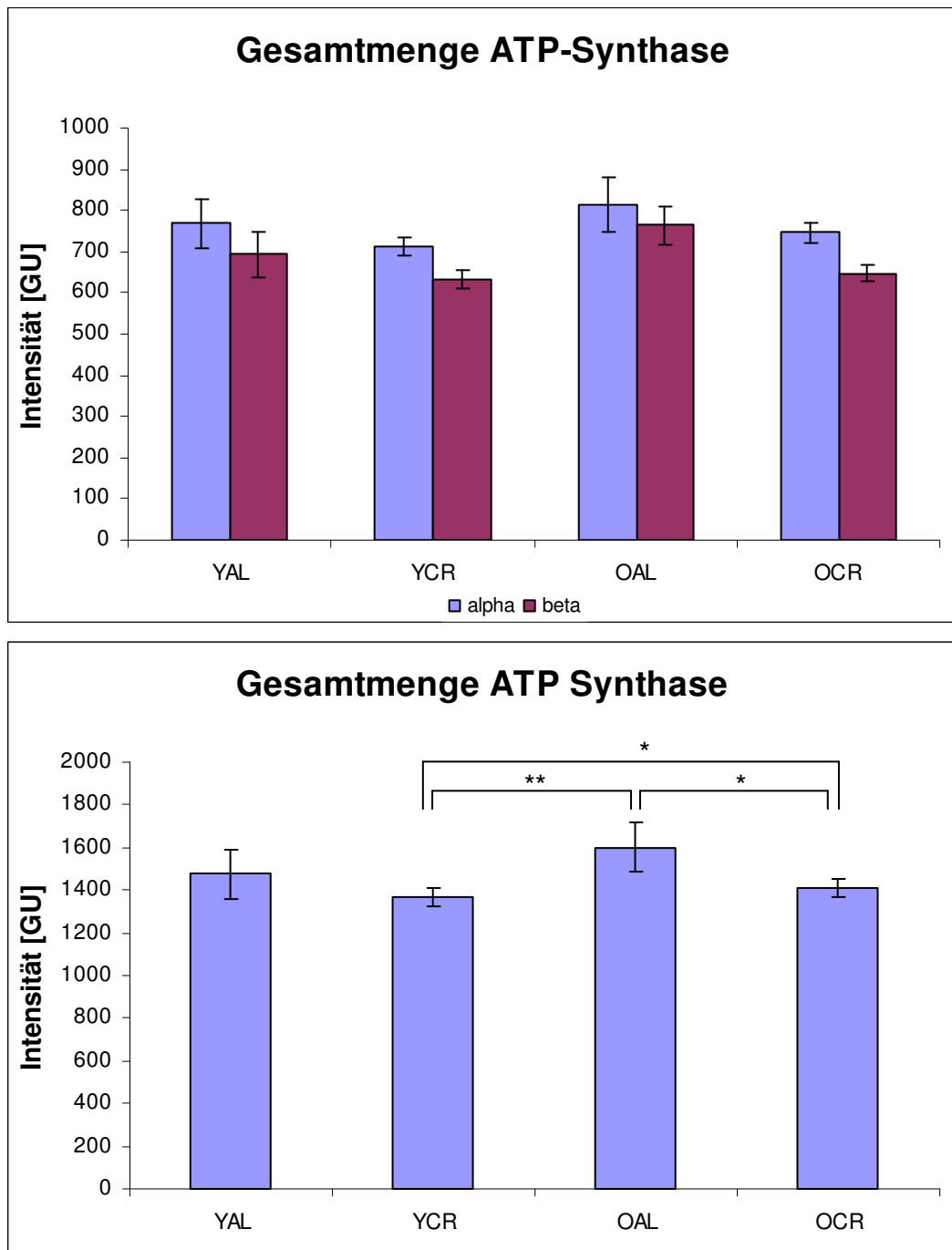
---

Für das Pentamer der ATP-Synthase können, wie in den Abbildungen 5.37 und 5.43 (oben) zu sehen, auf den 2D-Gelen nur die beiden größten Untereinheiten des cytosolischen  $F_1$ -Teils der ATP-Synthase,  $\alpha$  und  $\beta$ , gefunden werden. Die Intensitäten sind mit maximal 21 GU für die  $\beta$ -Untereinheit und maximal 18 GU für die  $\alpha$ -Untereinheit in einem sehr niedrigen Intensitätsbereich, was zu großen Abweichungen zwischen den Individuen der selben Gruppe führen kann und damit in relativ hohen Standardabweichungen resultiert. Nichtsdestotrotz sind die detektierbaren Änderungen der aufsummierten Untereinheiten in Abbildung 5.43 (unten) so groß, dass diese fast alle signifikant sind. Es kann allerdings keine Abhängigkeit der Änderungen von Alter oder der Ernährung gefunden werden, die für beide der jeweiligen Paare zutrifft. Die Intensitäten der untersuchten Gruppen liegen mit Werten zwischen 4 GU und 39 GU sehr weit auseinander. Die Werte zeigen bezüglich altersabhängigen Änderungen in der Proteinmenge des Pentamers für die *ad libitum* gefütterten Tiere eine nicht-signifikante Zunahme von 14%, während sich für die Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, eine sehr große Mengenabnahme von 90% detektieren lässt, die mit einem  $p$ -Wert von unter 0,01 deutlich signifikant ist. Betrachtet man sich die Änderungen, die mit einer Kalorienrestriktion einhergehen, so zeigt sich auch hier für das Pentamer keine einheitliche Tendenz der beiden untersuchten Wertepaare. Für die jungen Tiere ergibt sich eine Zunahme von signifikanten 86% mit applizierter Kalorienrestriktion, während im Gegensatz dazu für die alten Tiere eine ebenfalls signifikante Abnahme von 84% detektiert werden kann.

Bei der Gesamtmenge der ATP-Synthase, die in den beiden Diagrammen in Abbildung 5.44 abgebildet sind, wurden diejenigen Untereinheiten aufaddiert, die in allen Oligomeren der ATP-Synthase detektiert werden können. Da für das Pentamer nur die beiden größten Untereinheiten der ATP-Synthase,  $\alpha$  und  $\beta$ , als Spots auf den 2D-Gelen gefunden werden, können nur diese beiden Untereinheiten für die Berechnung der Gesamtsumme herangezogen werden. Dementsprechend sind für die Gesamtmenge der ATP-Synthase die Intensitäten in GU des Monomers und der Oligomere bis einschließlich Pentamer aufsummiert, jeweils  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit getrennt voneinander (Abb. 5.44 oben) und beide Summen der Untereinheiten nochmals addiert zu einem Gesamtwert (Abb. 5.44 unten).

Die Gesamtmenge der ATP-Synthase zeigt generell keine großen Mengenänderungen zwischen den verschiedenen Gruppen. Es können kleine altersbedingte Zunahmen der Gesamtmenge detektiert werden, sowohl für die *ad libitum* gefütterten Tiere als auch für die Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden. Für die normal gefütterten Tiere lässt sich eine Zunahme von 8% beobachten, die nicht signifikant ist, während für die CR-Gruppen sogar nur eine minimale Zunahme von 3,5% detektiert werden kann, die jedoch mit einem  $p$ -Wert von unter 0,05 signifikant ist. Des Weiteren zeigt sich eine CR-bedingte Abnahme der



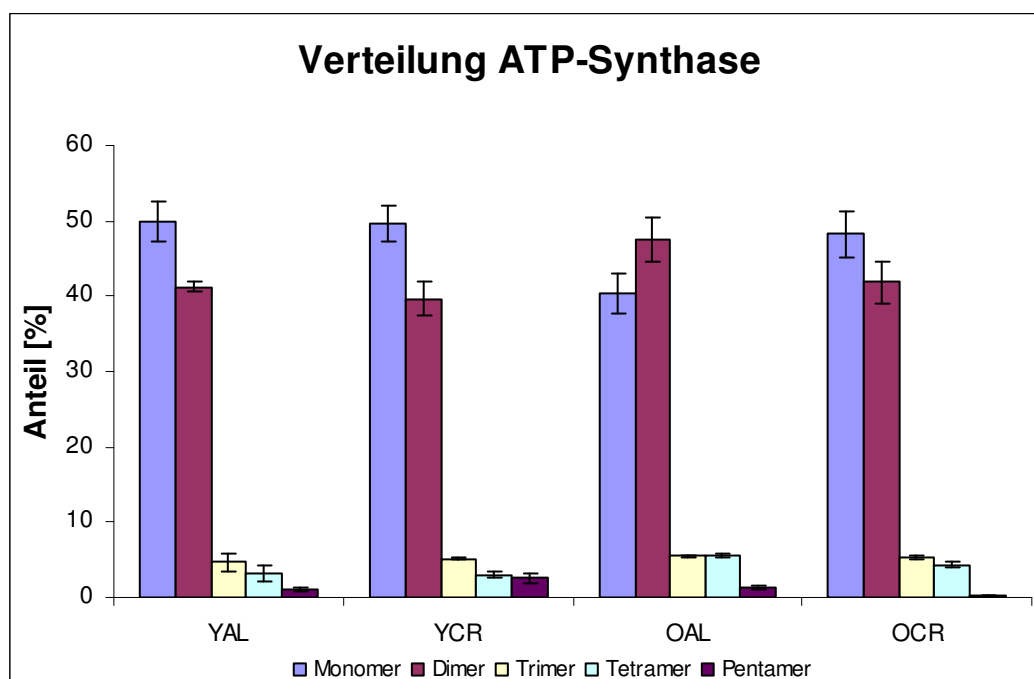


**Abb. 5.44:** Gesamtmenge der ATP-Synthase aus dem Monomer und den verschiedenen Oligomeren, aufgeteilt in die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  (oben) und deren Summe (unten). Es zeigt sich unabhängig von Alter oder Kalorienrestriktion eine vergleichbare stöchiometrische Verteilung der beiden untersuchten Untereinheiten. Die aufsummierten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zeigen sowohl eine geringfügige Zunahme der Menge mit dem Alter unabhängig von der Ernährung als auch eine leichte Abnahme mit applizierter Kalorienrestriktion in beiden Altersstufen. Jedoch fällt auf, dass generell nur sehr kleine Änderungen in der Gesamtmenge der ATP-Synthase zwischen den vier untersuchten Gruppen detektiert werden konnten.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

ATP-Synthase-Gesamtmenge unabhängig vom Alter der untersuchten Individuen. Für die jungen Tiere ergibt sich eine nicht-signifikante Mengenabnahme von 8%, während für die Gruppen der alten Tiere eine signifikante Abnahme von 12% detektiert werden konnte.

Die Erhöhung der Gesamtmenge der ATP-Synthase mit dem Alter beruht bei den *ad libitum* gefütterten Tieren zum größten Teil auf einer deutlichen Erhöhung des Dimers und des Tetramers. Bei den Dimeren zeigt sich eine um 290 GU höhere Intensität für die OAL-Gruppe im Vergleich zur YAL-Gruppe, bei den Tetrameren mit 188 GU eine fast doppelt so hohe Intensität wie bei den jungen Tieren. Bei diesen starken Zunahmen mit dem Alter spielen dann auch minimale Mengenabnahmen wie für das Monomer von 6% bzw. 88 GU keine Rolle mehr.



**Abb. 5.45:** Anteil der verschiedenen Oligomere an der Gesamtmenge der ATP-Synthase aus sub-sarcolemmalen Mitochondrien. Es zeigt sich für die beiden Gruppen der jungen Tiere und die OCR-Gruppe ein recht einheitliches Bild ohne deutliche Unterschiede. Einzig die OAL-Gruppe zeigt im Vergleich zu den anderen Gruppen ein verändertes Oligomer-Muster. Bei dieser Gruppe konnte eine größere Menge an Dimeren detektiert werden, sodass diese mit ca. 47% den größten Anteil an der Gesamtmenge ausmachen, während für die anderen Gruppen der Anteil der Dimere ca. 40% beträgt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen.

Die Abbildung 5.45 zeigt die Zusammensetzung des in Abbildung 5.44 bestimmten Wertes der ATP-Synthase-Gesamtmenge. Hier sind die Anteile des Monomers und eines jeden Oligomers von Dimer bis Pentamer an der Gesamtmenge der ATP-Synthase dargestellt. Es zeigen sich nur wenige Änderungen der Anteile zwischen den Gruppen, einzig die bei der OAL-Gruppe detektierte deutliche Mengenzunahme beim Dimer resultiert in einem erhöhten Dimer-Anteil und einem verringerten Monomer-Anteil im Vergleich zu den anderen Gruppen.

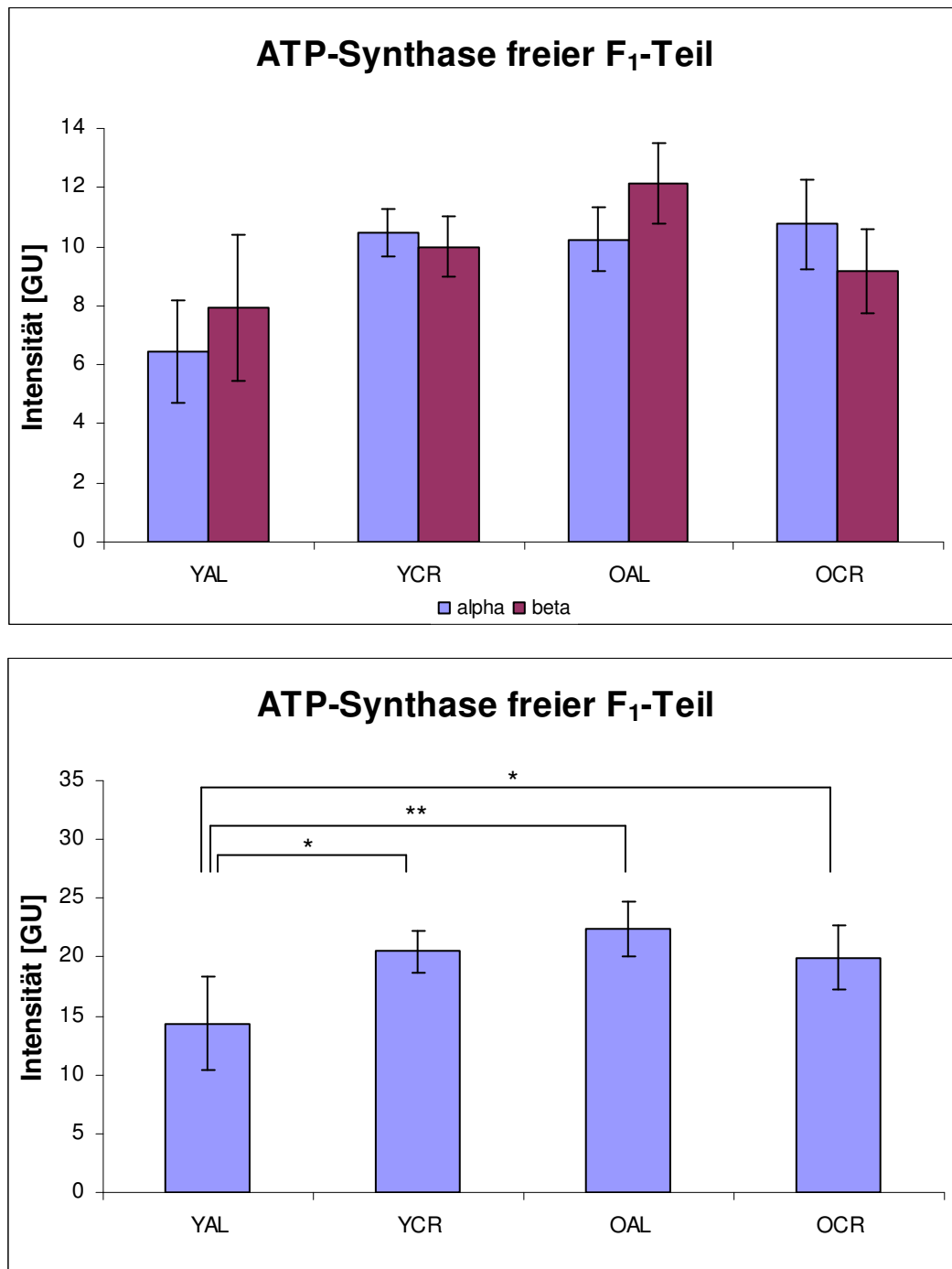
---

Bei allen anderen Gruppen nimmt das Monomer einen Anteil von knapp 50% an der Gesamtmenge ein, das Dimer hat mit um die 40% einen nur leicht geringeren Anteil. Die restlichen ca. 10% verteilen sich auf die größeren Oligomere Trimer, Tetramer und Pentamer. Von diesen in recht geringen Mengen vorhandenen Formen zeigt das Trimer am wenigsten Unterschiede des Anteils an der Gesamtmenge. Für alle Gruppen zeigt sich für das Trimer ein recht konstanter Anteil von ca. 5% der ATP-Synthase-Gesamtmenge.

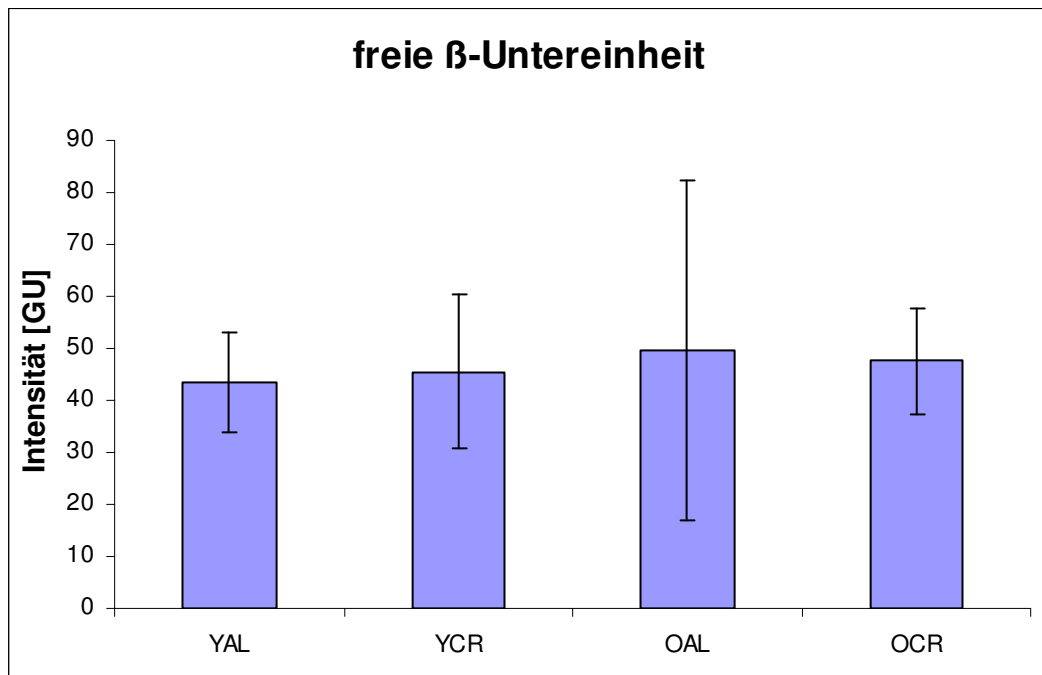
Der freie  $F_1$ -Teil, der den cytosolischen Kopfteil der ATP-Synthase ohne Verbindung zu dem membranständigen  $F_0$ -Teil darstellt, zeigt im 2D-Gel die typischen Proteinspots der Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ , die sich sehr gut detektieren und somit quantifizieren lassen. Noch nicht geklärt ist die Frage, ob es sich bei dem freien  $F_1$ -Teil um einen nicht-assemblierten Vorrat an ATP-Synthase oder um denaturierte ATP-Synthase-Komplexe handelt. Gezeigt werden konnte bisher nur, dass dieser unabhängig von den Solubilisierungsbedingungen auftritt<sup>[118]</sup>. Der katalytisch aktive freie  $F_1$ -Teil kann kein ATP generieren, sondern nur hydrolysieren und kann somit den Energiehaushalt der Zelle negativ beeinflussen. Abbildung 5.46 zeigt, dass auch bei dem freien  $F_1$ -Teil wie schon beim Pentamer die Intensitäten mit Werten von maximal 12 GU pro Untereinheit sehr niedrig sind. Auch hier ist keine einheitliche Tendenz der Änderungen mit dem Alter oder Kalorienrestriktion zu erkennen. Alternsbedingt ist für die normal gefütterten Tiere eine signifikante Zunahme von 56% zu beobachten, während die Individuen mit Kalorienrestriktion keine Änderung mit zunehmendem Alter zeigen. Für die jungen Tiere kann eine signifikante Erhöhung der Proteinmenge des Kopfteils von 42% und bei den alten Tieren eine nicht-signifikante Abnahme von 11% detektiert werden. Jedoch beträgt für alle Gruppen die Menge des  $F_1$ -Teils nur zwischen 0,8% und 1,5% der Gesamtmenge der ATP-Synthase.

Zusätzlich zum freien  $F_1$ -Teil der ATP-Synthase kann auf 2D-Gelen, in denen Mitochondrien aus Herzmuskelgewebe von Ratten aufgetrennt wurden, im niedrigen Massebereich der ersten Dimension (siehe Abb. 5.37) freie  $\beta$ -Untereinheit detektiert werden<sup>[93]</sup>. Wie es dazu kommt, dass sich ausgerechnet diese Untereinheit einzeln detektieren lässt, jedoch nicht die  $\alpha$ -Untereinheit, die nur wenige kDa größer ist als die  $\beta$ -Untereinheit und damit in der gleichen Gel-Region einzeln zu finden sein sollte, ist bisher nicht bekannt.

Die Abbildung 5.47 zeigt die ermittelten Intensitäten der freien  $\beta$ -Untereinheit in den vier untersuchten Gruppen. Es fällt auf, dass bei allen Gruppen die Standardabweichungen, die im Diagramm als Fehlerbalken dargestellt werden, sehr hoch sind, die Mittelwerte der Gruppen jedoch so gut wie keine Änderungen zeigen. Die Werte liegen für alle Gruppen zwischen 43 und 50 GU und somit können keine signifikanten Änderungen in der Menge der freien  $\beta$ -Untereinheit detektiert werden.



**Abb. 5.46:** Gesamtmenge des freien F<sub>1</sub>-Teils der ATP-Synthase aus subsarcolemmalen Mitochondrien, aufgeteilt in die Untereinheiten alpha und beta (oben) und deren Summe (unten). Die *ad libitum* gefütterten Tiere zeigen eine höhere Intensität der  $\beta$ -Untereinheit im Vergleich zur  $\alpha$ -Untereinheit, während die CR-Tiere einen leichten Überschuss der  $\alpha$ -Untereinheit aufweisen. Die aufsummierten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zeigen bei den *ad libitum* gefütterten Individuen mit dem Alter eine signifikante Zunahme der Menge von 56%. Für die jungen Tiere konnte eine Zunahme von 42% durch Kalorienrestriktion detektiert werden, während sich hingegen bei den alten Tieren eine geringe Abnahme von 11% beobachten lässt, die jedoch nicht signifikant ist. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei n = 5 für die jungen und n = 6 für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 )



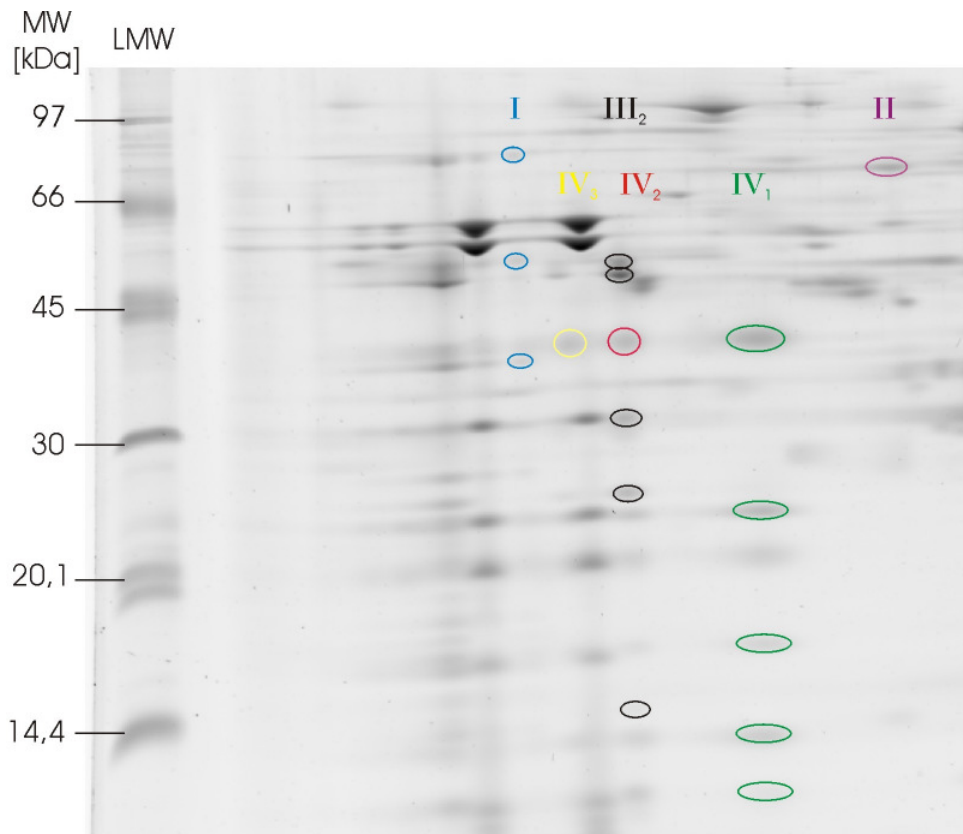
**Abb. 5.47:** Menge der freien  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase aus subsarcolemmalen Mitochondrien. Es konnte für die Mittelwerte der vier Gruppen keine signifikanten Änderungen in der Menge der freien  $\beta$ -Untereinheit detektiert werden, jedoch zeigen die teilweise sehr hohen Standardabweichungen der einzelnen Gruppen, dass innerhalb dieser starke Schwankungen in der Menge festgestellt werden konnten.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen.

#### 5.5.1.2 Individuelle Komplexe

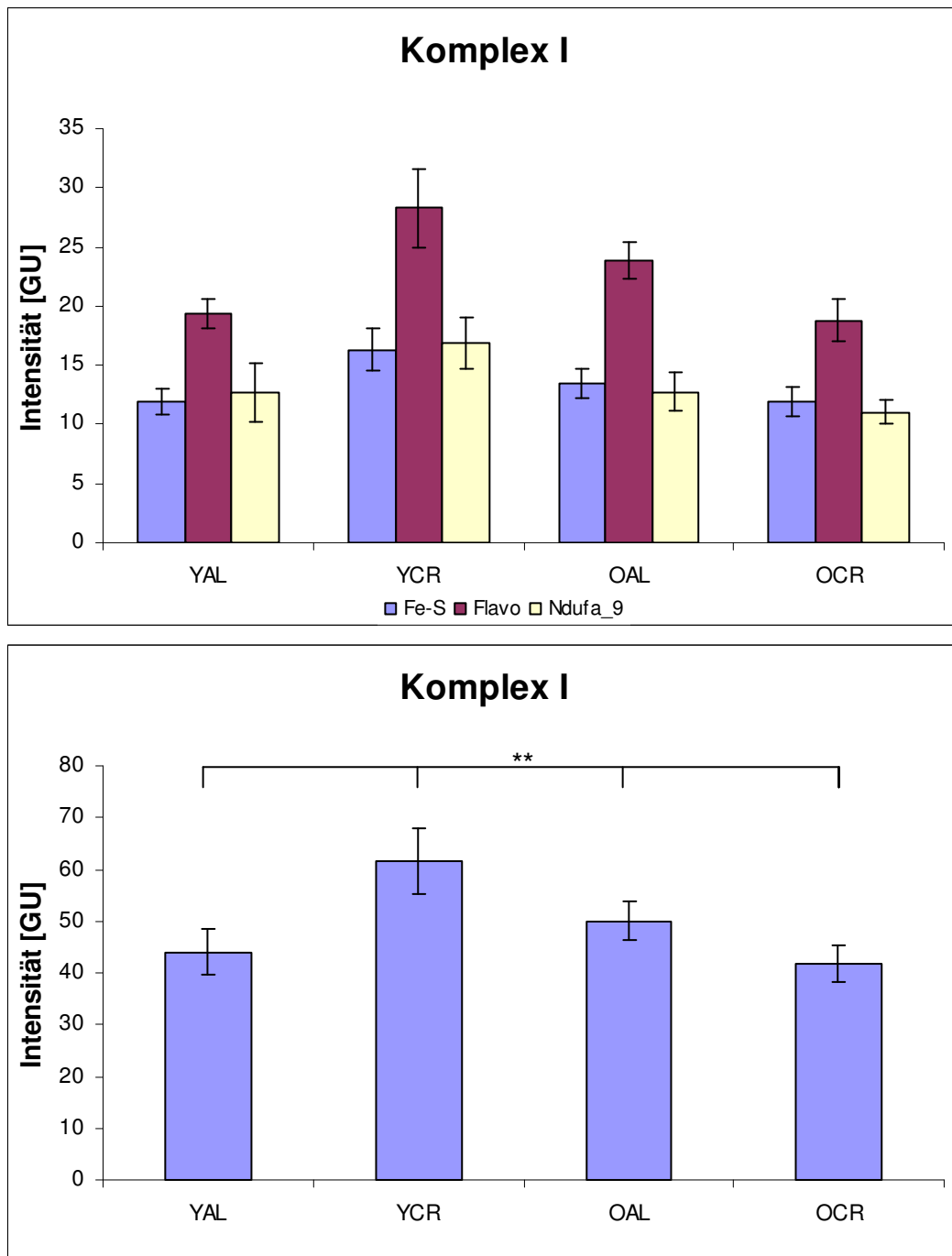
Die Atmungskettenkomplexe I bis IV sind neben der ATP-Synthase und den beiden mobilen Elektronencarriern Ubichinon und Cytochrom c die Hauptkomponenten der oxidativen Phosphorylierung innerhalb der inneren Mitochondrienmembran in Zellen und in der Thylakoidmembran von pflanzlichen Zellen. Die Atmungskettenkomplexe I bis IV können in Form des individuellen Komplexes, also nicht mit anderen Atmungskettenkomplexen zu Superkomplexen assoziiert, als Monomer und als Oligomer in der inneren Mitochondrienmembran vorliegen, wobei Komplex III unabhängig von Gewebe und Organismus ausschließlich als funktionelles Homodimer detektiert werden kann<sup>[119]</sup>.

In den hier untersuchten subsarcolemmalen Mitochondrien aus Rattenherz treten die Komplexe I, II und IV in monomerer Form auf, zusätzlich dazu liegt Komplex IV ebenfalls zu Oligomeren assoziiert vor. Es können demnach die Komplexe I und II, das bereits erwähnte Homodimer von Komplex III, Komplex IV sowie dessen Di- und Trimer in den hergestellten 2D-Gelen, wie beispielhaft in Abbildung 5.48 gezeigt, detektiert und quantifiziert werden.



**Abb. 5.48:** Ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby gefärbtes 2D-Gel der untersuchten subsarcolemmalen Mitochondrien aus Rattenherz. Die markierten Proteinspots zeigen Untereinheiten der detektierten und quantifizierten individuellen Komplexe II (lila), III<sub>2</sub> (schwarz) und I (blau), sowie von Komplex IV das Monomer (grün), das Dimer (rot) und das Trimer (gelb).

Die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, auch NADH-Dehydrogenase oder **Komplex I** der Atmungskette genannt, katalysiert die Oxidationsreaktion von in Glykolyse und Citratcyclus aufgebautem NADH und überträgt die beiden freigewordenen Elektronen auf den ebenfalls in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Elektronen-Carrier Ubichinon. Durch diesen Vorgang wird Ubichinon zu Ubichinol reduziert und durch die Reaktionskaskade in Komplex I werden pro übertragenem Elektron auf Ubichinon zwei Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum transloziert<sup>[120]</sup>. Durch diese Pump-Funktion trägt Komplex I neben den beiden Komplexen III<sub>2</sub> und IV, die ebenfalls Protonen über die innere Mitochondrienmembran transportieren, essentiell zur Generierung des elektrochemischen Protonengradienten bei. Komplex I ist mit einer Masse von ca. 1 MDa<sup>[121]</sup> in Eukaryonten mit Abstand der größte Atmungskettenkomplex und besitzt in Rinderherzmitochondrien 46 Untereinheiten<sup>[122]</sup>, von denen sieben mitochondrial codiert sind<sup>[123, 124]</sup>.



**Abb. 5.49:** Menge von individuellem Komplex I aus subsarcolemmalen Mitochondrien, aufgeteilt in dessen im 2D-Gel detektierbare Untereinheiten (oben) und deren Summe (unten). Es zeigt sich unabhängig von Alter oder Kalorienrestriktion eine vergleichbare stöchiometrische Verteilung der untersuchten Untereinheiten. Es kann für die Summe der Untereinheiten allerdings keine allgemeingültige Tendenz detektiert werden, die auf beide Vergleichspaare zutrifft. So zeigt sich bei den jungen Tieren eine CR-bedingte Zunahme von 40%, während die für die alten Tiere durch Kalorienrestriktion hervorgerufene Abnahme bei 16% liegt. Ebenso ist für die *ad libitum* gefütterten Tiere mit dem Alter eine leichte Zunahme von 14% detektierbar, für die Individuen mit Kalorienrestriktion hingegen eine Abnahme von 32%. Jegliche Änderungen zwischen den Gruppen sind signifikant. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei n = 5 für die jungen und n = 6 für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 )

---

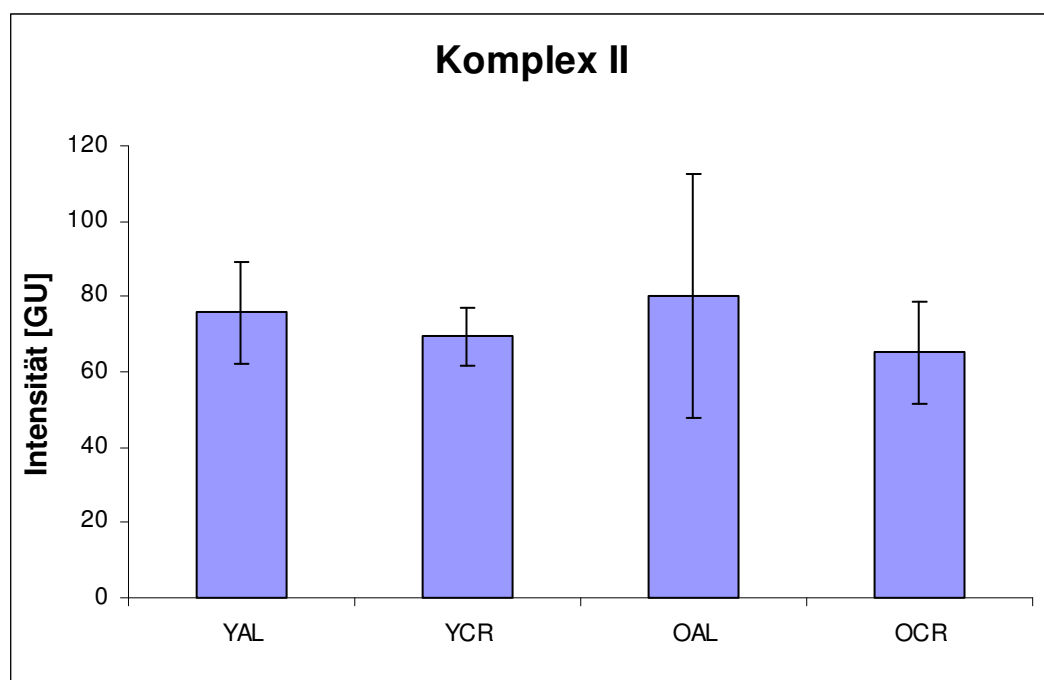
Für individuellen Komplex I können auf den 2D-Gelen der untersuchten subsarcolemmalen Mitochondrien drei Untereinheiten detektiert werden, deren Mengen in Abbildung 5.49 gezeigt sind. Zum besseren Vergleich der vier Gruppen wurden die Intensitäten der quantifizierbaren Untereinheiten des Komplexes addiert. Diese Summen zeigen einige Veränderungen sowohl mit dem Alter als auch mit applizierter Kalorienrestriktion, jedoch ist keine Tendenz des Effektes von Altern oder Kalorienrestriktion zu erkennen, die auf beide Vergleichspaare zutrifft. Während für die jungen Individuen eine CR-bedingte Zunahme der Komplex I-Menge von 40% detektiert werden kann, ist ein ähnlicher Effekt für die alten Individuen nicht zu beobachten. Bei den beiden Gruppen der alten Tiere zeigt sich nämlich nicht nur keine Mengenzunahme, sondern sogar eine Abnahme der Komplex I-Menge um 16%. Beide Änderungen sind mit *p*-Werten von unter 0,01 signifikant. Ein ähnlich uneinheitliches Bild zeigt der Vergleich beider Ernährungsformen bezüglich des Alterns. Während die *ad libitum* gefütterten Tiere eine leichte altersbedingte Mengenzunahme von 14% aufweisen, kann für die Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, eine altersabhängige Mengenabnahme von 32% beobachtet werden. Auch diese beiden detektierten Änderungen sind mit *p*-Werten unter 0,01 signifikant. Generell ist die Menge von individuellem Komplex I für alle untersuchten Gruppen recht gering, da die aufsummierten Intensitäten nur Werte zwischen 41 und 61 GU erreichen. Der Anteil an der Gesamtmenge von detektierbarem Komplex I (individuell und Superkomplexe) beträgt für den individuellen Komplex bei allen Gruppen maximal 11% (Abbildung 5.63).

Die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase, auch Succinat-Dehydrogenase oder **Komplex II** genannt, ist ein Enzymkomplex, der sowohl eine zentrale Rolle im Citratcyclus als auch in der oxidativen Phosphorylierung einnimmt. Der Enzymkomplex besteht aus 4 Untereinheiten, von denen 2 in die Matrix hineinragen und katalytisch aktiv sind und 2 die Verankerung des Komplexes in der Membran gewährleisten<sup>[125]</sup>. Innerhalb der Atmungskette nimmt Komplex II eine Sonderstellung ein. So ist er der einzige Atmungskettenkomplex, der keine mitochondrial codierten Untereinheiten besitzt und keine Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum transloziert. Des Weiteren ist er das einzige membranständige Enzym des Citratcyclus. Komplex II katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat und transportiert die dabei frei werdenden Elektronen über den Co-Faktor FADH<sub>2</sub>, das kovalent an den Enzymkomplex gebunden ist, drei verschiedene Fe-S-Cluster und eine Hämgruppe zu Ubichinon, welches wie bei Komplex I beide Elektronen aufnimmt und somit zu Ubichinol reduziert wird<sup>[126]</sup>. Die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase transportiert als einziger Enzymkomplex der Atmungskette keine Protonen durch die innere Mitochondrienmembran und ist damit nicht direkt an der Generierung des elektrochemischen Protonengradienten beteiligt. Aufgrund dessen entsteht durch die Reduktion von FADH<sub>2</sub> weniger Energie in Form von ATP als bei der Reduktion von



NADH+H<sup>+</sup>, da der elektrochemische Protonengradient durch Komplex II nicht weiter aufgebaut wird und damit die ATP-Synthase einen verminderten Protoneneinstrom zur ATP-Generierung nutzen kann.

In den für diese Arbeit angefertigten 2D-Gelen kann für Komplex II nur eine einzige Untereinheit detektiert werden. Es handelt sich hierbei um die Untereinheit A (Flavoprotein) mit einer Masse von 71,6 kDa. Komplex II kann hier nicht als Oligomer oder als Teil eines Superkomplexes gefunden werden. Abbildung 5.50 zeigt die Mengen dieser Untereinheit als Maß für die Menge des gesamten Proteinkomplexes der Succinat-Dehydrogenase. Es zeigt sich bei beiden Altersgruppen eine CR-bedingte Mengenabnahme. Diese beträgt für die jungen Individuen 9% und für die alten Tiere 19%. Beide Abnahmen sind allerdings statistisch nicht signifikant. Für die Alternseffekte zeigt sich ein uneinheitliches Bild bei den unterschiedlichen Ernährungsformen. Es kann für die *ad libitum* gefütterten Ratten eine minimale Zunahme von 6% detektiert werden, während sich bei den Tieren mit applizierter Kalorienrestriktion sogar eine minimale Mengenabnahme für Komplex II von ebenfalls 6% beobachten lässt. Aufgrund der teilweise recht hohen Standardabweichungen des Mittelwertes zeigen auch diese Änderungen keine Signifikanz.



**Abb. 5.50:** Menge der einzigen detektierbaren Untereinheit A (Flavoprotein) des individuellen Komplex II aus subsarcolemmalen Mitochondrien. Es zeigt sich eine CR-bedingte Abnahme der Proteinmenge von 9% bei den jungen Tieren und 19% bei den alten Tieren. Als alternsbedingte Änderungen können für die *ad libitum* gefütterten Tiere eine minimale Zunahme von 6% und eine leichte Abnahme bei den Tieren mit Kalorienrestriktion von ebenfalls 6% beobachtet werden. Allerdings sind keine der hier gezeigten Änderungen signifikant.

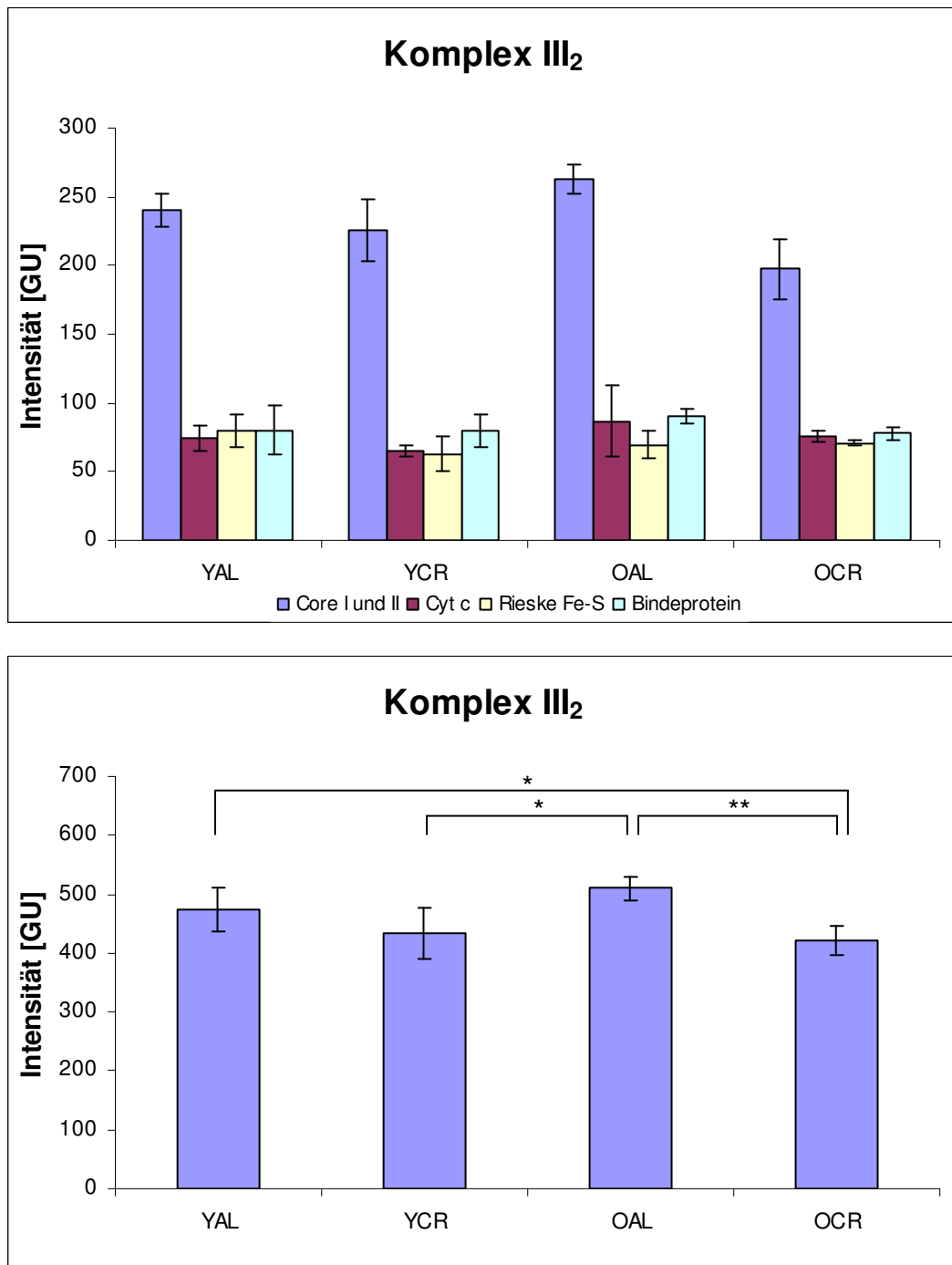
Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes bei n = 5 für die jungen und n = 6 für die alten Individuen.

---

Die Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase, auch Cytochrom-c-Reduktase oder **Komplex III** der Atmungskette genannt, oxidiert den Zwei-Elektronen-Carrier Ubichinol zu Ubichinon und transferiert die dabei frei werdenden Elektronen auf den Ein-Elektronen-Carrier Cytochrom c<sup>[127]</sup>. Während dieses Vorgangs werden für jedes Ubichinol, das oxidiert wird, vier Protonen durch die innere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum transportiert. Damit ist auch Komplex III wesentlich am Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten beteiligt, der von der ATP-Synthase zur ATP-Generierung genutzt wird. Aufgebaut ist Komplex III aus 11 Untereinheiten, von denen 10 von der nucleären DNA codiert werden und nur eine in der mitochondrialen DNA vorliegt<sup>[128]</sup>.

Komplex III ist neben Komplex I die Hauptquelle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)<sup>[129]</sup>, die als Nebenprodukte bei den Redoxreaktionen an den katalytischen Untereinheiten der Multi-Enzymkomplexe entstehen. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Superoxidradikal-Anionen, die durch weitere Reaktionen beispielsweise zu Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikalen<sup>[130]</sup> und zu Peroxynitrit<sup>[131]</sup>, eine reaktive Stickstoffspezies (RNS), umgesetzt werden kann. Mittlerweile ist bekannt, dass ein konstantes Niveau an ROS auch in gesunden Zellen vorhanden ist und eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen und bei Signalübertragungen in und zwischen Zellen spielt<sup>[132-134]</sup>, jedoch kann eine erhöhte ROS-Menge schwere Schäden an Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren hervorrufen.

Komplex III liegt stets als Homodimer vor<sup>[119]</sup>, deren zwei prägnantesten Untereinheiten, Core I und Core II, in einem 2D-Gel sehr dicht nebeneinander liegen. Die Lage und Anordnung dieser beiden Untereinheiten ist typisch für Komplex III<sub>2</sub> oder Komplex III<sub>2</sub>-enthaltende Superkomplexe. Aufgrund ihrer räumlichen Nähe ist es allerdings schwierig, beide Untereinheiten getrennt zu quantifizieren, da es teilweise zu leichten Überlappungen kommen kann (siehe Abb. 5.48). Aus diesem Grund wurden die ursprünglich getrennt quantifizierten Core I- und Core II-Proteine für Abbildung 5.51 (oben) addiert. Für einen schnellen Überblick und zur besseren Vergleichbarkeit wurde alle detektierbaren Untereinheiten von Komplex III<sub>2</sub> aufaddiert und ebenfalls in Abbildung 5.51 (unten) dargestellt. Hier zeigt sich für beide Altersgruppen eine Mengenabnahme des individuellen Komplexes bei applizierter Kalorienrestriktion. Für die beiden Gruppen der jungen Tiere beträgt die CR-bedingte Abnahme 9%, während bei den alten Individuen eine Mengenabnahme von 17% detektiert werden kann, die mit einem *p*-Wert von unter 0,01 signifikant ist. Für die Alternseffekte kann keine einheitliche Tendenz beobachtet werden, die auf beide Vergleichspaare zutrifft. Während die *ad libitum* gefütterten Ratten eine leichte Zunahme von 7% mit dem Alter zeigen, kann für die Ratten, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, sogar eine minimale Mengenabnahme von 3% detektiert werden. Bei diesen sehr kleinen Änderungen konnte jedoch keine Signifikanz festgestellt werden.



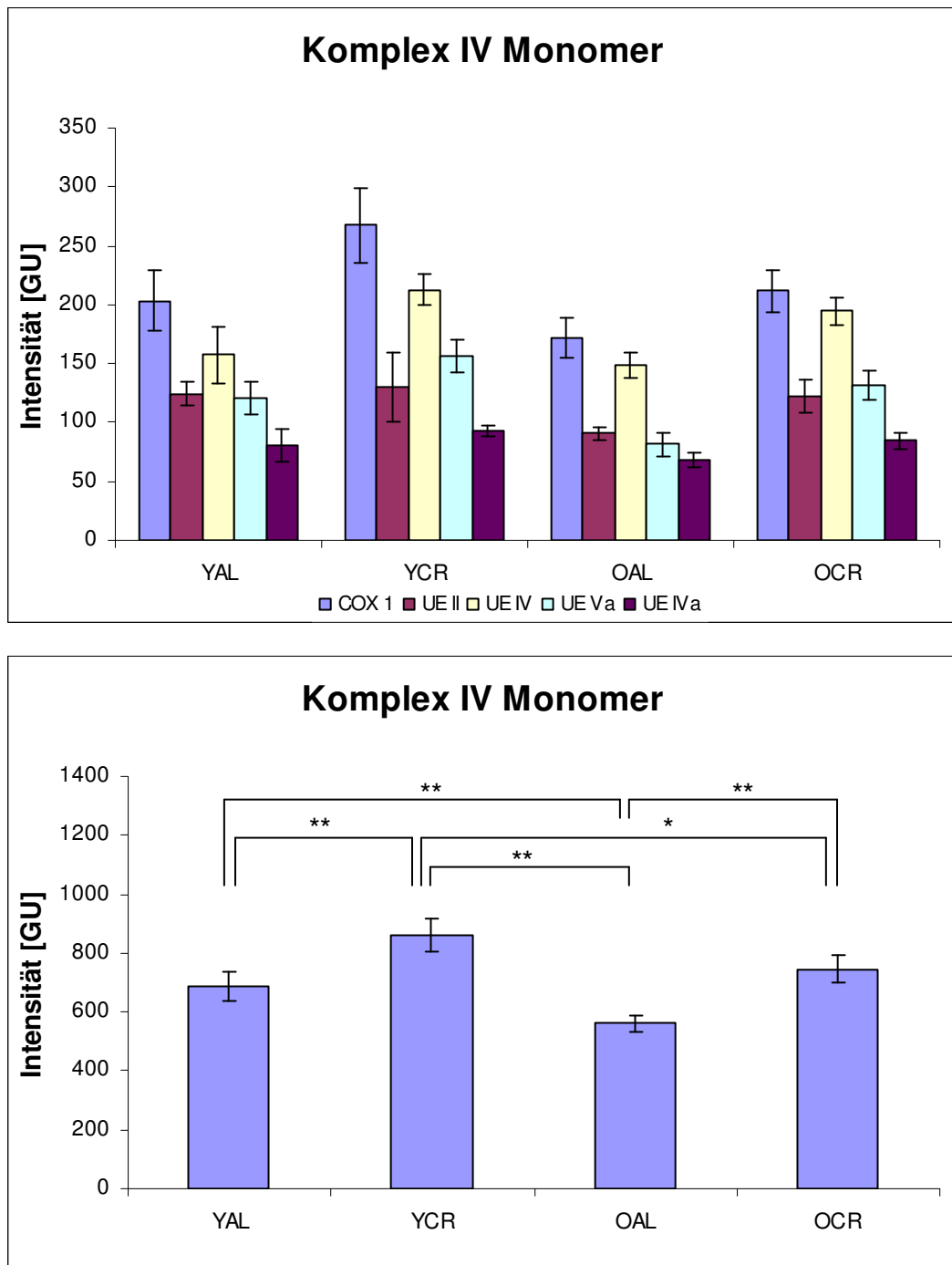
**Abb. 5.51:** Menge von individuellem Komplex III<sub>2</sub> aus subsarcolemmalen Mitochondrien, aufgeteilt in dessen im 2D-Gel detektierbare Untereinheiten (oben) und deren Summe (unten). Es zeigt sich unabhängig von Alter oder Kalorienrestriktion eine ähnliche stöchiometrische Verteilung der untersuchten Untereinheiten. Die aufsummierten Untereinheiten zeigen eine CR-bedingte Mengenabnahme für Komplex III<sub>2</sub> von 9% für die jungen Tiere und 17% für die alten Tiere, wobei nur die zuletzt genannte Abnahme signifikant ist. Eine einheitliche Tendenz für das Altern kann nicht detektiert werden, da sich für die *ad libitum* gefütterten Tiere eine Zunahme um 7% zeigt, während für die CR-Gruppen eine minimale Abnahme von 3% zu verzeichnen ist. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei n = 5 für die jungen und n = 6 für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 )

---

**Komplex IV** der Atmungskette, auch Cytochrom-c-O<sub>2</sub>-Oxidoreduktase oder Cytochrom-c-Oxidase genannt, ist in allen aerob lebenden Organismen der terminale Akzeptor der Atmungskette und überträgt Elektronen von Cytochrom c auf Sauerstoff. Für diese Übertragung werden nach der Oxidation von Cytochrom c die Elektronen über Kupferzentren und Hämgruppen zum Endakzeptor Sauerstoff transportiert, für dessen Reduktion zu Wasser 4 Moleküle Cytochrom c, ein O<sub>2</sub>-Molekül und 4 Protonen aus der Matrix benötigt werden, um 2 Moleküle Wasser zu produzieren. Zusätzlich zu den 4 Protonen, die der Matrix für die Bildung von Wasser entzogen werden, transportiert Komplex IV weitere 4 Protonen aus der Matrix durch die Membran in den Intermembranraum<sup>[119]</sup>. Damit ist er essentiell für den Aufbau und die Erhaltung des elektrochemischen Protonengradienten, der die ATP-Synthase energetisiert und die damit verbundene Generierung von Energie in Form von ATP antreibt. Der Komplex besteht aus 13 Untereinheiten<sup>[135]</sup>, von denen 3 mitochondrial codiert sind. Durch Röntgenstrukturanalysen<sup>[136, 137]</sup> konnte nachgewiesen werden, dass Komplex IV meist als Homodimer vorliegt. Bei Studien, die auf Solubilisierung mit milden Detergenzien und nativer Gelelektrophorese beruhen, ist jedoch das Monomer die am häufigsten auftretende Form von Komplex IV, für das ebenso wie für das Dimer Aktivität nachgewiesen werden konnte<sup>[138]</sup>.

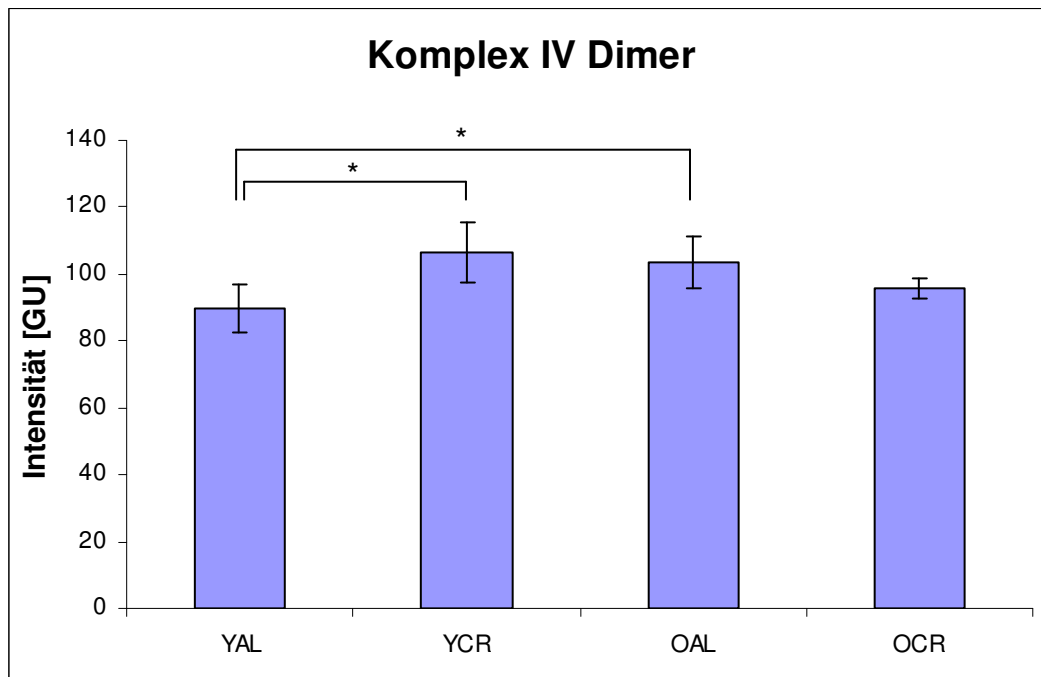
Komplex IV kann in den 2D-BN/SDS-Gelen der subsarcolemmalen Mitochondrien aus Rattenherz in unterschiedlichen Formen gefunden werden, neben dem Monomer treten auch die beiden Oligomere bestehend aus zwei bzw. drei Kopien des Proteinkomplexes, also Dimer und Trimer, auf. Während für das Monomer mit einer Masse von ca. 200 kDa fünf Untereinheiten zugeordnet und quantifiziert werden können, detektiert man sowohl beim Dimer als auch beim Trimer von Komplex IV ausschließlich COX 1, die größte Untereinheit des Proteinkomplexes. Die kleineren Untereinheiten sind in diesen Masseregionen der ersten Dimension entweder mit anderen Proteinen überlagert oder aber aufgrund der geringeren Gesamtmenge der Oligomere im Vergleich zum Monomer nicht detektierbar.

Das Monomer von Komplex IV, dargestellt in Abbildung 5.52, zeigt signifikante CR-bedingte Mengenzunahmen in beiden untersuchten Alterstufen von 25% bei den jungen und 33% bei den alten Tieren. Beide Mengenzunahmen sind mit *p*-Werten von unter 0,01 signifikant. Zusätzlich zur CR-bedingten Zunahme konnte eine altersabhängige Abnahme der Menge des Monomers von Komplex IV detektiert werden. Für die *ad libitum* gefütterten Tieren beträgt die Abnahme 18% (*p*-Wert unter 0,01) und für die Tiere mit applizierter Kalorienrestriktion beläuft sich diese auf 13% (*p*-Wert unter 0,05).



**Abb. 5.52:** Menge des Monomers von individuellem Komplex IV aus subsarcolemmalen Mitochondrien, aufgeteilt in dessen im 2D-Gel detektierbare Untereinheiten (oben) und deren Summe (unten). Es zeigt sich unabhängig von Alter oder Kalorienrestriktion eine ähnliche stöchiometrische Verteilung der untersuchten Untereinheiten. Die aufsummierten Untereinheiten zeigen signifikante CR-bedingte Mengenzunahmen von 25% für die jungen Tiere und 33% für die alten Tiere. Signifikante Änderungen können ebenfalls mit zunehmendem Alter detektiert werden. Für die *ad libitum* gefütterten Tiere beträgt die Mengenabnahme 18%, für die Individuen mit Kalorienrestriktion 13%.

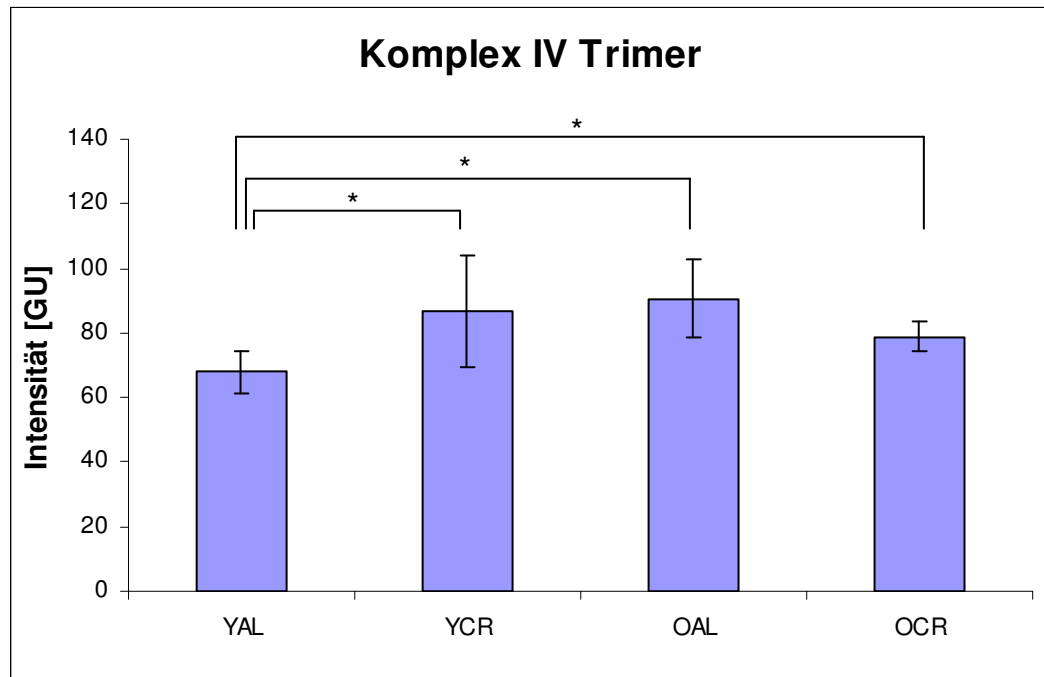
Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei n = 5 für die jungen und n = 6 für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 )



**Abb. 5.53:** Menge der einzigen detektierbaren Untereinheit COX 1 des Dimers von individuellem Komplex IV aus subsarcolemmalen Mitochondrien. Es lässt sich keine einheitliche Tendenz bezüglich Altern und Kalorienrestriktion erkennen. Während für die jungen Tiere eine signifikante CR-bedingte Mengenzunahme von 18% detektiert werden kann, zeigen die alten Tiere eine nicht signifikante Abnahme von 8%. Bei den *ad libitum* gefütterten Tieren ist eine signifikante Mengenzunahme von 15% zu verzeichnen, bei den CR-Gruppen hingegen kann eine Abnahme von 10% detektiert werden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

Für die beiden oligomeren Formen von individuellem Komplex IV, das Dimer und das Trimer, zeigen sich die gleichen Tendenzen für Effekte des Alterns und der Kalorienrestriktion. Während die detektierten Änderungen für das Dimer in Abbildung 5.53 mit maximal 18% noch recht moderat ausfallen, können für die Menge des Trimers, dargestellt in Abbildung 5.54, Änderungen von bis zu 33% beobachtet werden. Bei beiden Oligomeren zeigen sich bei den jungen Tieren CR-bedingte Mengenzunahmen von 18% für die Dimere und 28% für die Trimere. Beide Erhöhungen der Proteinmenge sind mit  $p$ -Werten unter 0,05 signifikant. Im Gegensatz dazu kann für die alten Tiere jeweils eine Abnahme der Proteinmenge mit applizierter Kalorienrestriktion beobachtet werden, die aber für keines der Oligomere einen Signifikanzwert von unter 0,05 erreicht. Die Proteinmenge nimmt durch die Kalorienrestriktion bei den Dimeren um 8% und bei den Trimeren um 13% ab. Betrachtet man den Effekt des Alterns auf die Proteinmenge von COX 1 in den oligomeren Formen von individuellem Komplex IV, zeigt sich für die *ad libitum* gefütterten Tiere jeweils eine Mengenzunahme, die bei den Dimeren 15% und bei den Trimeren sogar 33% beträgt. Auch hier sind beide detektierten Änderungen mit  $p$ -Werten von unter 0,05 signifikant. Betrachtet man die auftretenden Änderungen, die auf das Altern zurückzuführen sind, bei den beiden

Gruppen der Individuen mit applizierter Kalorienrestriktion, so zeigen sich bei beiden oligomeren Formen leichte Abnahmen der Proteinmenge. Diese belaufen sich für das Dimer auf 10% und für das Trimer auf 9%. Allerdings konnte auch hier für diese Änderungen kein Signifikanzwert von unter 0,05 erreicht werden.



**Abb. 5.54:** Menge der einzigen detektierbaren Untereinheit COX 1 des Trimers von individuellem Komplex IV aus subsarolemmlen Mitochondrien. Es lässt sich keine einheitliche Tendenz bezüglich Altern und Kalorienrestriktion erkennen. Während für die jungen Tiere eine signifikante CR-bedingte Mengenzunahme von 28% detektiert werden kann, zeigen die alten Tiere eine nicht signifikante Abnahme von 13%. Des Weiteren ist bei den *ad libitum* gefütterten Tieren eine signifikante Mengenzunahme von 33% zu verzeichnen, bei den CR-Gruppen hingegen kann eine Abnahme von 9% detektiert werden.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

Bei verschiedenen oligomeren Formen eines Komplexes ist die Gesamtmenge aller Formen und dessen Verteilung auf diese eine wichtige Größe. Um die Gesamtmenge zu erhalten, müssen diejenigen Untereinheiten, die in allen Oligomeren vorhanden sind, addiert werden. Bei Komplex IV handelt es sich dabei nur um die Untereinheit COX 1, da nur diese für das Dimer und das Trimer quantifiziert werden können. Die für Komplex IV ermittelte Gesamtintensität von COX 1 und deren Verteilung auf die entsprechenden Formen sind in Abbildung 5.55 dargestellt. Es fällt auf, dass sich die Gesamtmenge an Komplex IV zwischen den Gruppen YAL, OAL und OCR kaum unterscheidet. Einzig die Gruppe der jungen Tiere mit Kalorienrestriktion zeigt eine deutlich höhere Intensität als die anderen Gruppen. Diese Proteinmengenzunahme beläuft sich auf 27% gegenüber der Vergleichsgruppe der jungen

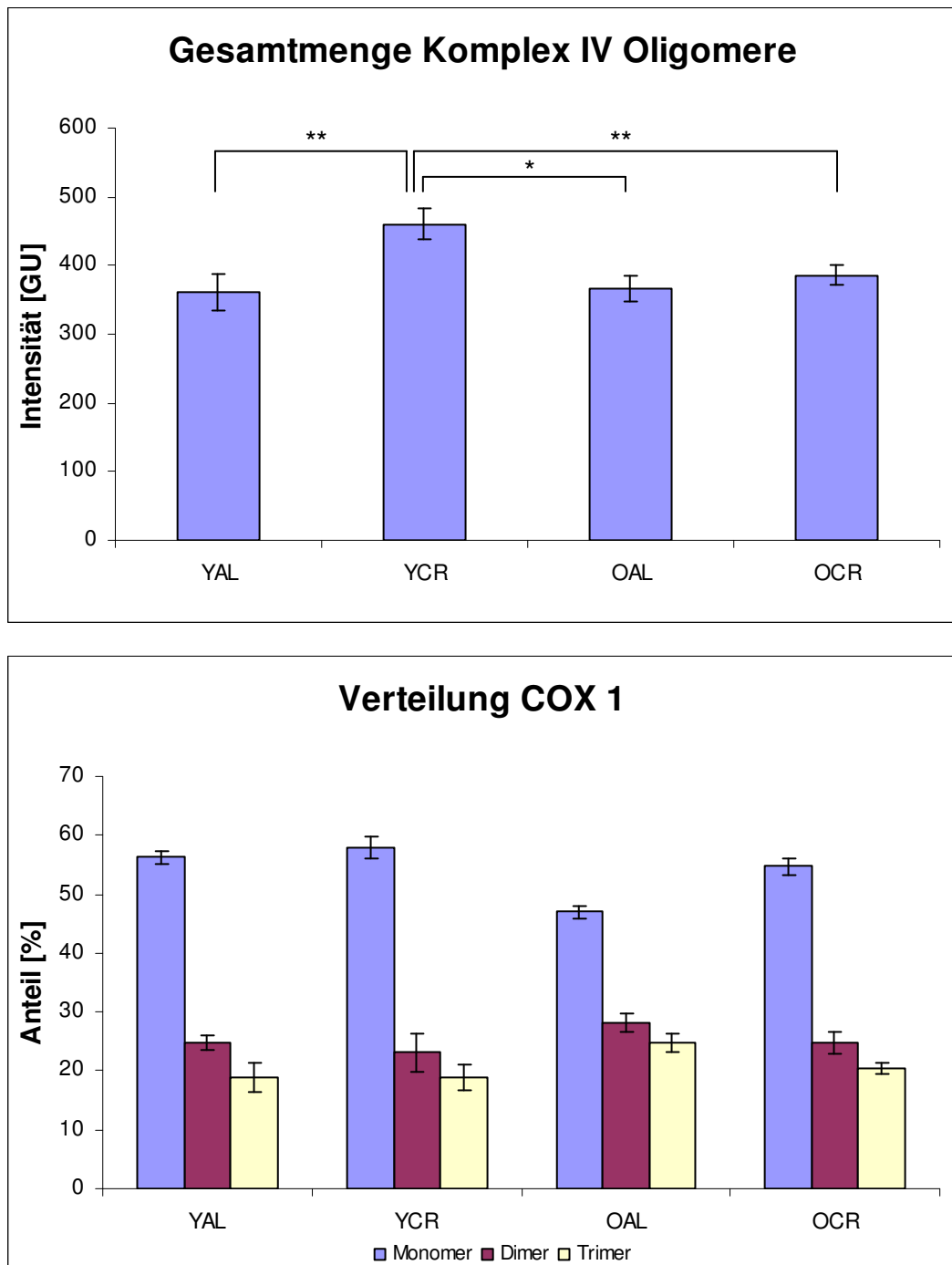
---

*ad libitum* gefütterten Tiere. Diese CR-bedingte Erhöhung der Menge an individuellem Komplex IV ist mit einem *p*-Wert von unter 0,01 höchst signifikant. Auch für die beiden Gruppen der alten Tiere ist ein minimaler Anstieg von 5% mit reduzierter Futtergabe zu verzeichnen. Aufgrund dieser geringen Abweichung und der zwar kleinen, aber vorhandenen Standardabweichung der beiden Werte, ist diese Proteinmengenerhöhung allerdings nicht signifikant. Ein Alternseffekt ist bei den *ad libitum* gefütterten Tieren nicht zu beobachten. Die Gesamtintensitäten dieser beiden Gruppen liegen mit Werten von 361 GU und 367 GU so dicht bei einander, dass man hier nicht von einer Änderung der Proteinmenge sprechen kann. Im Gegensatz dazu ist aufgrund der deutlich erhöhten Gesamtmenge an Komplex IV der YCR-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen eine alternsbedingte Abnahme von 16% bei den Tieren mit Kalorienrestriktion zu beobachten, die ebenfalls mit einem *p*-Wert von unter 0,01 signifikant ist.

Die Proteinmengen der größten Untereinheit COX 1 in der dimeren Form von Komplex IV zeigen Intensitäten mit Werten von bis zu 106 GU (siehe Abb. 5.53). Die Werte der Trimere liegen für alle vier untersuchten Gruppen um bis zu 22 GU niedriger als die der Dimere (siehe Abb. 5.54). Vergleicht man diese mit den Intensitäten der detektierten COX 1-Untereinheit des Monomers mit durchschnittlich über 200 GU (siehe Abb. 5.52), so erreichen die Intensitäten der dimeren und trimeren Form von Komplex IV zusammengenommen bei fast allen Gruppen nicht die Intensität des Monomers. Die genaue Verteilung der Gesamtmenge auf das Monomer und auf die oligomeren Formen von individuellem Komplex IV kann dem unteren Diagramm der Abbildung 5.55 entnommen werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass zwischen den beiden Gruppen der jungen Tiere und die der alten Tiere mit Kalorienrestriktion kaum Unterschiede in der Verteilung auf die verschiedenen Formen zu beobachten sind. Der Anteil des Monomers beträgt bei diesen drei Gruppen zwischen 54,7% und 59,0%. Einzig die OAL-Gruppe zeigt eine deutlich veränderte Aufteilung der Gesamtintensität auf die verschiedenen Komplex IV-Formen. Der Anteil des Monomers liegt bei nur 47%. Dementsprechend entfallen auf die beiden Oligomere höhere Anteile von 28,3% für die Dimere und 24,8% für die Trimere. Bei den anderen drei Gruppen belaufen sich diese Werte bei den Dimeren auf 23,1% bis 24,9% und bei den Trimeren auf 18,9% bis 20,5%.

Bezüglich der Gesamtintensität und der Verteilung dieser auf die verschiedenen Komplex IV-Formen handelt es sich interessanterweise nicht um die selbe Gruppe, die sich jeweils von den anderen stark unterscheidet. Die deutliche Erhöhung der Gesamtintensität der YCR-Gruppe resultiert demnach nicht aus einer Intensitätserhöhung von nur einer bestimmten Form von Komplex IV. Im Gegensatz dazu resultiert die veränderte Verteilung der OAL-Gruppe im Wesentlichen aus der deutlich niedrigeren Intensität des Monomers von Komplex IV im Vergleich zu den anderen Gruppen.





**Abb. 5.55:** Gesamtmenge der Untereinheit COX 1 aus Mono-, Di- und Trimer von individuellem Komplex IV (oben) und deren Anteil an der Gesamtmenge (unten). Die Gesamtmenge zeigt zwischen den Gruppen nur wenige Änderungen, einzig die Gruppe der jungen Tiere mit Kalorienrestriktion zeigt eine deutliche und signifikante Proteinzunahme von 19% bis 27% gegenüber den anderen drei Gruppen. Die Verteilung der Gesamtmenge auf die verschiedenen Formen des individuellen Komplexes zeigt für die beiden Gruppen der jungen Tiere und die OCR-Gruppe ein recht einheitliches Bild, während die OAL-Gruppe als einzige eine leicht veränderte Verteilung mit einem Anteil des Monomers von unter 50% aufweist.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

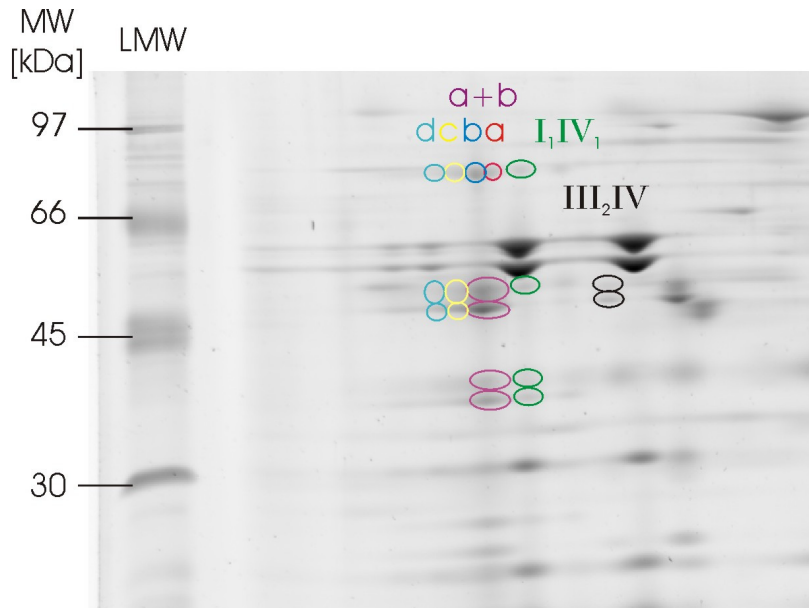
---

### 5.5.1.3 Superkomplexe

Als Superkomplex wird die Organisation verschiedener Komplexe der Atmungskette zu stöchiometrischen übergeordneten Strukturen bezeichnet. Bereits 1955 äußerten Chance und Williams<sup>[139]</sup> die Vermutung, dass die Atmungskettenkomplexe I bis IV geordnet in der inneren Mitochondrienmembran vorliegen, was bis heute als „Solid State“-Modell bezeichnet wird. Nachdem in den folgenden Jahren und Jahrzehnten nur individuell vorliegende aktive Komplexe isoliert werden konnten<sup>[140]</sup>, postulierten 1986 Hackenbrock *et al.*<sup>[141]</sup> ein weiteres Modell zum Vorliegen der Atmungskettenkomplexe in der Membran. Die als „Random Collision“-Modell bekannt gewordene These besagt, dass die Komplexe unabhängig voneinander zufällig in der Membran verteilt sind und der Elektronentransfer durch Zusammenstöße der Komplexe und Elektronen-Carrier untereinander erfolgt, die sich durch laterale Diffusion frei in der fluiden Membran bewegen können. Hauptsächlich durch die Methodik der nativen Gelelektrophorese konnte allerdings mittlerweile gezeigt werden, dass sich stabile und aktive Superkomplexe aus Prokaryonten<sup>[142-144]</sup> und Eukaryonten wie Hefe<sup>[145]</sup>, filamentösen Pilzen<sup>[146, 147]</sup>, Pflanzen<sup>[116, 148-150]</sup> und Säugetieren<sup>[110, 113, 151]</sup> isolieren lassen. Das gleichzeitige Auftreten von individuellen Komplexen und Superkomplexen deutet darauf hin, dass eine Mischform aus „Solid State“- und „Random Collision“-Modell in der Mitochondrienmembran vorzuliegen scheint<sup>[152]</sup>. In Säugetier-Mitochondrien konnten bisher eine Vielzahl von Superkomplexen isoliert werden, an denen bis zu drei verschiedene Atmungskettenkomplexe beteiligt waren, jedoch konnten bisher nur die Komplexe I, III<sub>2</sub> und IV in unterschiedlichen Stöchiometrien in einem Superkomplex nachgewiesen werden<sup>[113, 153, 154]</sup>. Für Komplex II, die Succinat-Dehydrogenase, konnte bis heute keine Beteiligung an mitochondrialen Superkomplexen in höheren Organismen gezeigt werden<sup>[113, 153, 155, 156]</sup>. Superkomplexe, die aus den drei individuellen Komplexen I, III<sub>2</sub> und IV bestehen, werden auch als Respirasom bezeichnet, da diese in Anwesenheit der Elektronen-Carrier Ubichinon und Cytochrom c dazu in der Lage sind, autonom die Zellatmung durchzuführen, ohne dass die Elektronen den Superkomplex verlassen müssen. Neben dieser Art von Elektronen-Transfer, die häufig als Substratkanalisierung bezeichnet wird, werden die Erhöhung der katalytischen Aktivität<sup>[154]</sup>, die Minimierung der ROS-Produktion und die Stabilisierung der individuellen Komplexe<sup>[146]</sup> als Hauptgrund für das Vorkommen von Superkomplexen genannt. Obwohl Superkomplexe bisher in den meisten daraufhin untersuchten Organismen aufgetrennt, isoliert oder charakterisiert wurden, wird ihr Vorkommen nach wie vor kontrovers betrachtet. Es fehlt der letzte Beweis, dass die Zusammenlagerung der individuellen Komplexe zu Superkomplexen keine Artefakte der zur Isolierung verwendeten Methodik darstellen und die Superkomplexe in den bisher beschriebenen Formen auch *in vivo* in den jeweiligen Organismen vorzufinden sind.

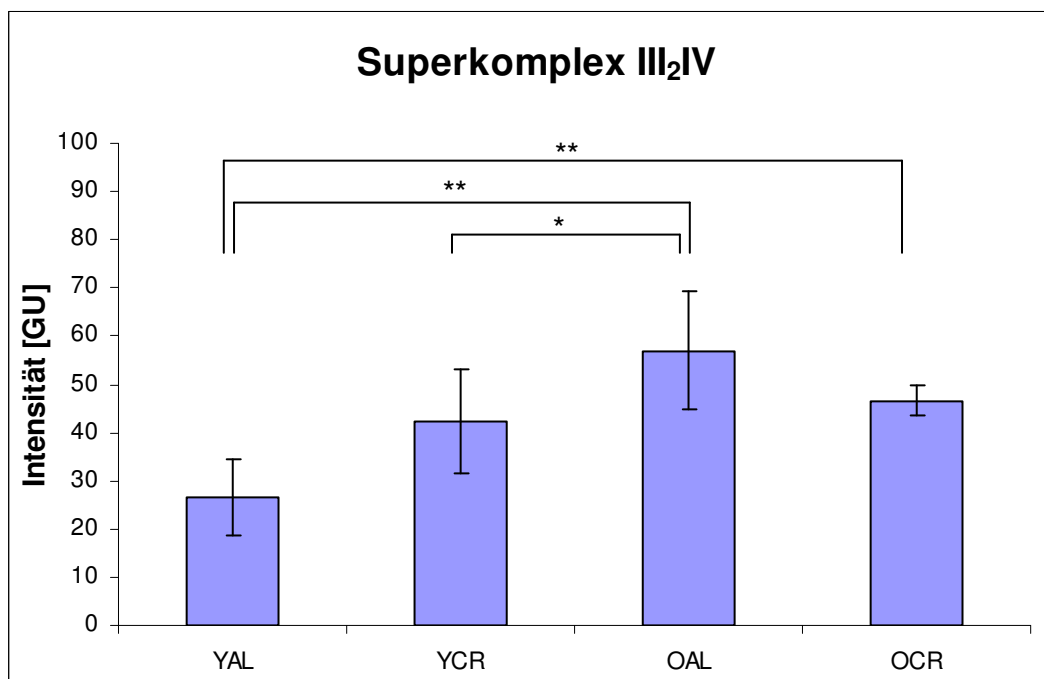
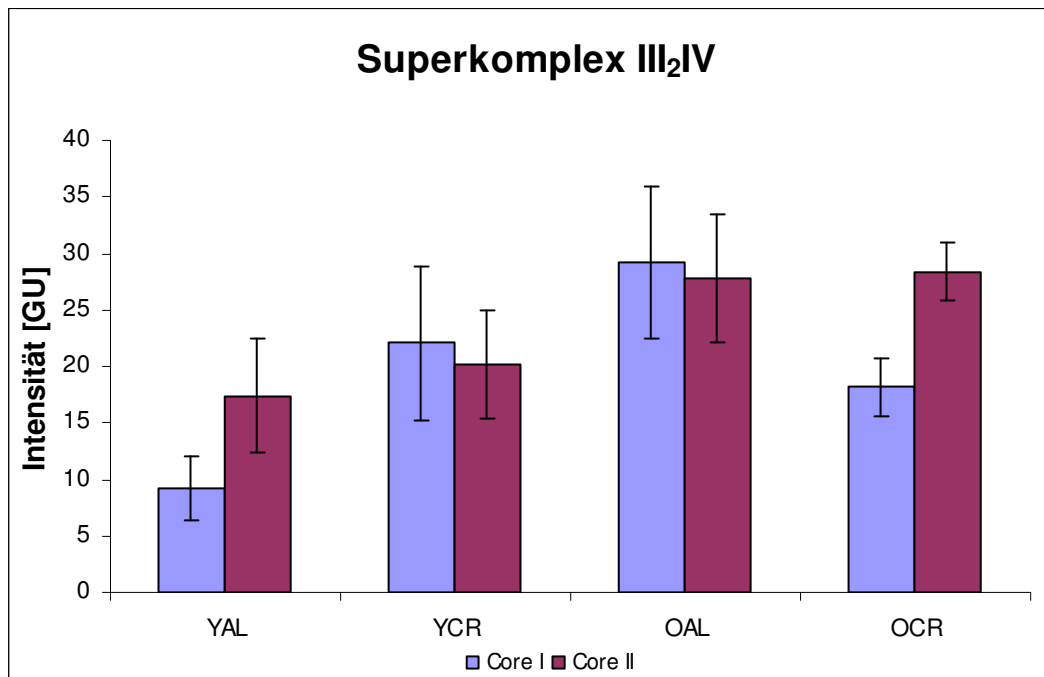
In dieser Arbeit konnten in den angefertigten 2D-BN/SDS-Gelen der subsarcolemmalen Mitochondrien verschiedene Superkomplexe gefunden und quantifiziert werden. Dabei handelt es sich um den sogenannten „kleinen“ Superkomplex III<sub>2</sub>IV, Superkomplex I<sub>1</sub>IV<sub>1</sub> und die Superkomplexe a bis d (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>0-3</sub>). Bei der Identifizierung der zugehörigen Untereinheiten auf den 2D-Gelen konnten für Komplex I-enthaltende Superkomplexe die Untereinheiten Fe-S-Protein, Flavo-Protein und Ndufa\_9 detektiert werden. Von Komplex III<sub>2</sub> konnten die Core I- und Core II-Untereinheiten und von Komplex IV ausschließlich die COX 1-Untereinheit quantifiziert werden. Die höchstmögliche Anzahl an Untereinheiten, die für einen Superkomplex bestehend aus den Einzelkomplexen I, III<sub>2</sub> und IV theoretisch gefunden werden kann, beträgt demnach sechs. Jedoch zeigt sich auf den Gelen, dass die Untereinheiten Flavo-Protein von Komplex I und die Core I-Untereinheit von Komplex III<sub>2</sub> sehr dicht beieinander laufen, was eine Quantifizierung der beiden unabhängig voneinander unmöglich macht. Daher werden sie zusammen als ein Proteinspot quantifiziert. Das Gleiche gilt für die Superkomplexe a (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>) und b (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>). Diese laufen aufgrund des geringen Masseunterschiedes von nur ca. 200 kDa in der ersten Dimension, dem BN-Gel, ebenfalls sehr dicht beieinander. Obwohl sie in der ersten Dimension als Banden noch recht gut voneinander zu trennen sind, ergibt sich für die zweite Dimension, das SDS-Gel, eine deutliche Überlappung derjenigen Untereinheiten, die in großen Mengen vorhanden sind. Durch die Denaturierung der nativen Komplexe bereits kurz vor dem eigentlichen SDS-Gellauf (siehe dazu Kapitel 4.4.3) kommt es zu leichten Diffusionseffekten der Untereinheiten und damit zu einer Überlagerung der dicht beieinander liegenden Superkomplexe. Da sich die überlappenden Untereinheiten trotz 3D-Ansicht der Auswertungssoftware nicht eindeutig voneinander trennen lassen, werden sie zusammen quantifiziert. Demnach werden die Mengen der Superkomplexe a und b als Gesamtmenge beider Superkomplexe angegeben. Nichtsdestotrotz kann eine Aufteilung dieser Gesamtmenge auf die einzelnen Superkomplexe erfolgen, da sich die größte Untereinheit von Komplex I, das Fe-S-Protein, aufgrund der geringeren Menge und einer dadurch geringeren Überlappung einzeln quantifizieren lässt. Das Problem der sich überlappenden Untereinheiten kann in einer deutlich verminderten Ausprägung auch für Superkomplex c gefunden werden. Da dieser in einer geringeren Menge vorhanden ist als Superkomplex b hält sich der Grad der Überlappung in Grenzen und kann mithilfe der 3D-Ansicht der Auswertungssoftware einzeln quantifiziert werden, was ebenso für Superkomplex d gilt.

Die genaue Lage der Superkomplexe im 2D-Gel und deren in dieser Arbeit quantifizierten Untereinheiten sind der Abbildung 5.56 zu entnehmen. Zusammen quantifizierte Spots werden als ein Spot dargestellt.

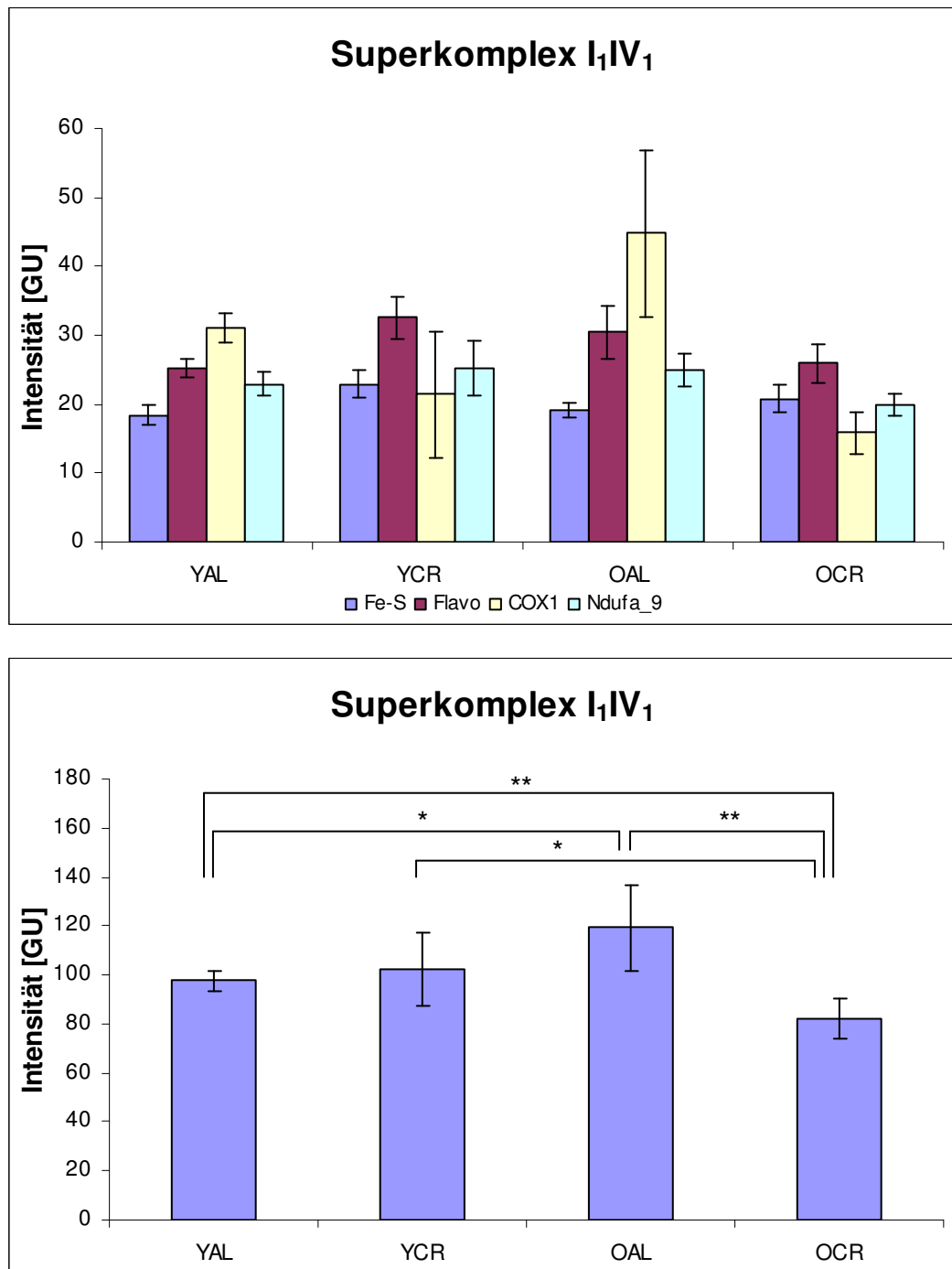


**Abb. 5.56:** Ausschnitt eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby gefärbten 2D-Gels der untersuchten subsarcolemmalen Mitochondrien aus Rattenherz. Die markierten Proteinspots zeigen Untereinheiten der detektierten und quantifizierten Superkomplexe  $\text{III}_2\text{IV}$  (schwarz),  $\text{I}_1\text{IV}_1$  (grün), a ( $\text{I}_1\text{III}_2$ , rot), b ( $\text{I}_1\text{III}_2\text{IV}$ , blau), c ( $\text{I}_1\text{III}_2\text{IV}_2$ , gelb) und d ( $\text{I}_1\text{III}_2\text{IV}_3$ , türkis). Vier der fünf detektierbaren Untereinheiten der Superkomplexe a und b können nicht eindeutig voneinander getrennt werden und wurden daher zusammen quantifiziert (lila).

Bei dem mit einer Masse von ca. 700 kDa kleinsten Superkomplex handelt es sich um ein Aggregat aus einem Homodimer von Komplex III und einer Kopie von Komplex IV. In Abbildung 5.57 ist zu erkennen, dass ausschließlich zwei Untereinheiten von Komplex III für diesen Superkomplex detektiert werden können. Dabei handelt es sich um die beiden Core-Untereinheiten I und II. Diese sind für den Superkomplex durch teilweise Überlappung häufig schwer akkurat voneinander zu trennen, was in variierenden Verhältnissen der Untereinheiten zueinander resultiert. Daher werden diese zum besseren Vergleich der Gruppen untereinander aufsummiert. Es ergibt sich für die *ad libitum* gefütterten Tiere eine sehr starke signifikante Erhöhung der Superkomplex-Menge um 113% mit dem Altern, das heißt, es tritt etwas mehr als eine Verdopplung der Menge mit fortgeschrittenem Alter auf. Dieser starke altersbedingte Zuwachs ist für die Individuen mit applizierter Kalorienrestriktion nicht zu detektieren. Es zeigt sich zwar auch für die beiden CR-Gruppen ein Anstieg in der Menge von Superkomplex  $\text{III}_2\text{IV}$ , allerdings ist dieser mit 10% nicht nur sehr klein sondern auch nicht signifikant. Die Mengenänderungen durch Kalorienrestriktion zeigen ein sehr uneinheitliches Bild. So kann für die jungen Tiere eine Zunahme beobachtet werden, die mit 58% zwar sehr stark ausfällt, jedoch aufgrund der höheren Standardabweichung bei niedrigen Intensitäten nicht signifikant ist. Im Gegensatz dazu kann für die alten Individuen statt einer deutlichen Zunahme sogar eine Abnahme von 18% detektiert werden, die allerdings ebenfalls wie die CR-bedingte Änderung bei den jungen Tieren nicht signifikant ist.



**Abb. 5.57:** Menge des Superkomplexes III<sub>2</sub>IV aus subsarcolemmalen Mitochondrien, aufgeteilt in dessen im 2D-Gel detektierbare Untereinheiten Core I und Core II von Komplex III<sub>2</sub> (oben) und deren Summe (unten). Die aufsummierten Untereinheiten zeigen eine altersbedingte Zunahme der Menge um signifikante 113% bei den *ad libitum* gefütterten Tieren und um 10% bei den Tieren mit Kalorienrestriktion, die allerdings nicht signifikant ist. Bei den jungen Tieren zeigt sich ebenfalls eine CR-bedingte Mengenzunahme von 58%, während für die alten Individuen eine Abnahme von 18% detektiert werden kann. Beide Änderungen sind jedoch nicht signifikant. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei n = 5 für die jungen und n = 6 für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 )



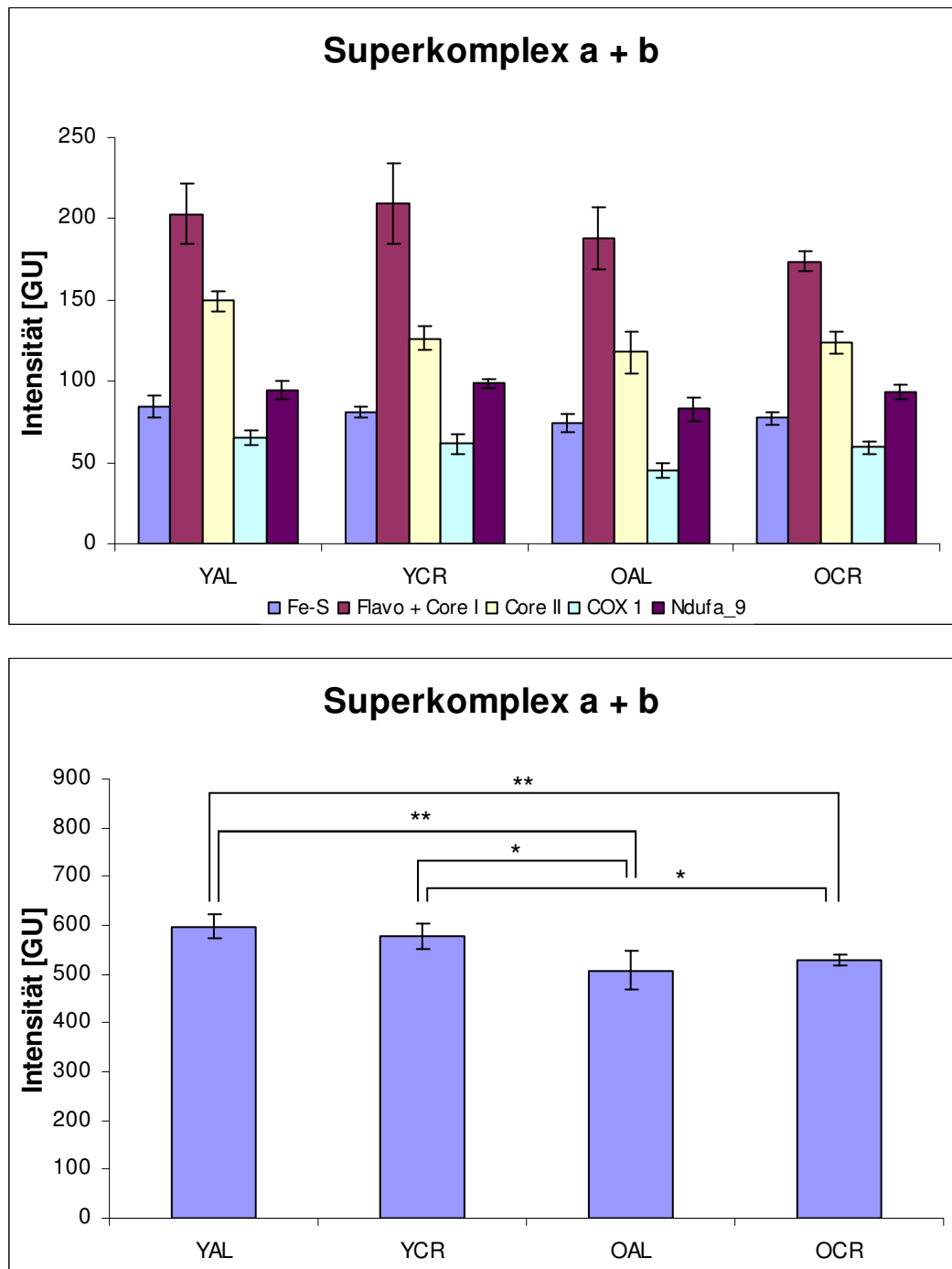
**Abb. 5.58:** Menge des Superkomplexes I<sub>1</sub>IV<sub>1</sub> aus subsarcolemmalen Mitochondrien, aufgeteilt in dessen im 2D-Gel detektierbare Untereinheiten (oben) und deren Summe (unten). Die aufsummierten Untereinheiten zeigen für die *ad libitum* gefütterten Tiere eine signifikante altersbedingte Zunahme der Menge um 22%, während für die Tiere mit Kalorienrestriktion eine ebenfalls signifikante Mengenabnahme von 19% beobachtet werden kann. Bei den jungen Tieren zeigt sich eine mit 4% minimale CR-bedingte Zunahme, die nicht signifikant ist. Im Gegensatz dazu kann für die alten Individuen eine Abnahme von signifikanten 31% mit applizierter Kalorienrestriktion detektiert werden.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei n = 5 für die jungen und n = 6 für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 )

---

Der kleinste Superkomplex, der Komplex I enthält, ist der Superkomplex I<sub>1</sub>IV<sub>1</sub>, der auch in den 2D-Gelen der subsarcolemmalen Mitochondrien zu finden ist. Es können die drei Untereinheiten von Komplex I detektiert werden, die bereits für den individuellen Komplex quantifiziert werden konnten. Dabei handelt es sich um das Fe-S-Protein, das Flavo-Protein und Ndufa\_9. Zusätzlich dazu kann COX 1, die größte Untereinheit von Komplex IV, detektiert werden. Die Mengen der quantifizierten Untereinheiten von Superkomplex I<sub>1</sub>IV<sub>1</sub> und deren Summen sind in Abbildung 5.58 dargestellt. Dabei zeigt sich bei den *ad libitum* gefütterten Tieren eine altersbedingte signifikante Zunahme der Menge an Superkomplex I<sub>1</sub>IV<sub>1</sub> um 22%, während die Individuen mit applizierter Kalorienrestriktion im Gegensatz dazu eine Abnahme von 19% zeigen, die aber ebenfalls signifikant ist. Betrachtet man die Effekte, die mit der Kalorienrestriktion bei beiden Altersstufen einhergehen, so lässt sich keine klare Tendenz erkennen, die unabhängig vom Alter der CR-Tiere auftritt. So zeigt sich beispielsweise bei den jungen Tieren eine so minimale nicht-signifikante CR-bedingte Zunahme von 4%, dass man hier von keiner Mengenänderung des Superkomplexes in jungem Alter der Tiere von 6,5 Monaten sprechen kann. Betrachtet man die alten Individuen, so fällt auf, dass durch die Kalorienrestriktion eine Mengenabnahme von 31% auftritt, die mit einem *p*-Wert von unter 0,01 sehr signifikant ist.

Die Superkomplexe I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> und I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV, auch a und b genannt, müssen aufgrund der Nähe zueinander zusammen quantifiziert werden. Die beiden Superkomplexe unterscheiden sich in einer Kopie von Komplex IV, die in Superkomplex b vorhanden ist, in Superkomplex a hingegen nicht. Für beide Superkomplexe können die drei Untereinheiten Fe-S-Protein, Flavo-Protein und Ndufa\_9 von Komplex I detektiert werden, die bereits für den individuellen Komplex quantifiziert werden konnten, sowie die beiden prägnantesten Untereinheiten von Komplex III, die Core-Proteine I und II. Für Superkomplex b, der zusätzlich noch eine Kopie von Komplex IV enthält, kann ebenfalls die COX 1-Untereinheit detektiert werden. Da in beiden Superkomplexen die Untereinheiten von den Komplexen I und III<sub>2</sub> gefunden werden können, überlappen diese aufgrund des geringen Masseunterschieds der Superkomplexe in der ersten Dimension. Eine Trennung der überlappenden Proteinspots ist nicht möglich, weshalb die Gesamtmenge beider Superkomplexe zusammen in Abbildung 5.59 angegeben wird. Eine weitere in 2D-BN/SDS-Gelen auftretende Besonderheit jeglicher Superkomplexe, die sowohl Komplex I als auch Komplex III<sub>2</sub> enthalten, ist die Übereinanderlagerung der Flavo-Untereinheit von Komplex I und der Core I-Untereinheit von Komplex III<sub>2</sub>. Diese beiden Untereinheiten haben eine sehr ähnliche Masse und bilden quasi einen einzigen etwas gestreckten Proteinspot in einem 2D-Gel. Daher müssen auch diese Untereinheiten für die Superkomplexe a bis d gemeinsam quantifiziert werden.



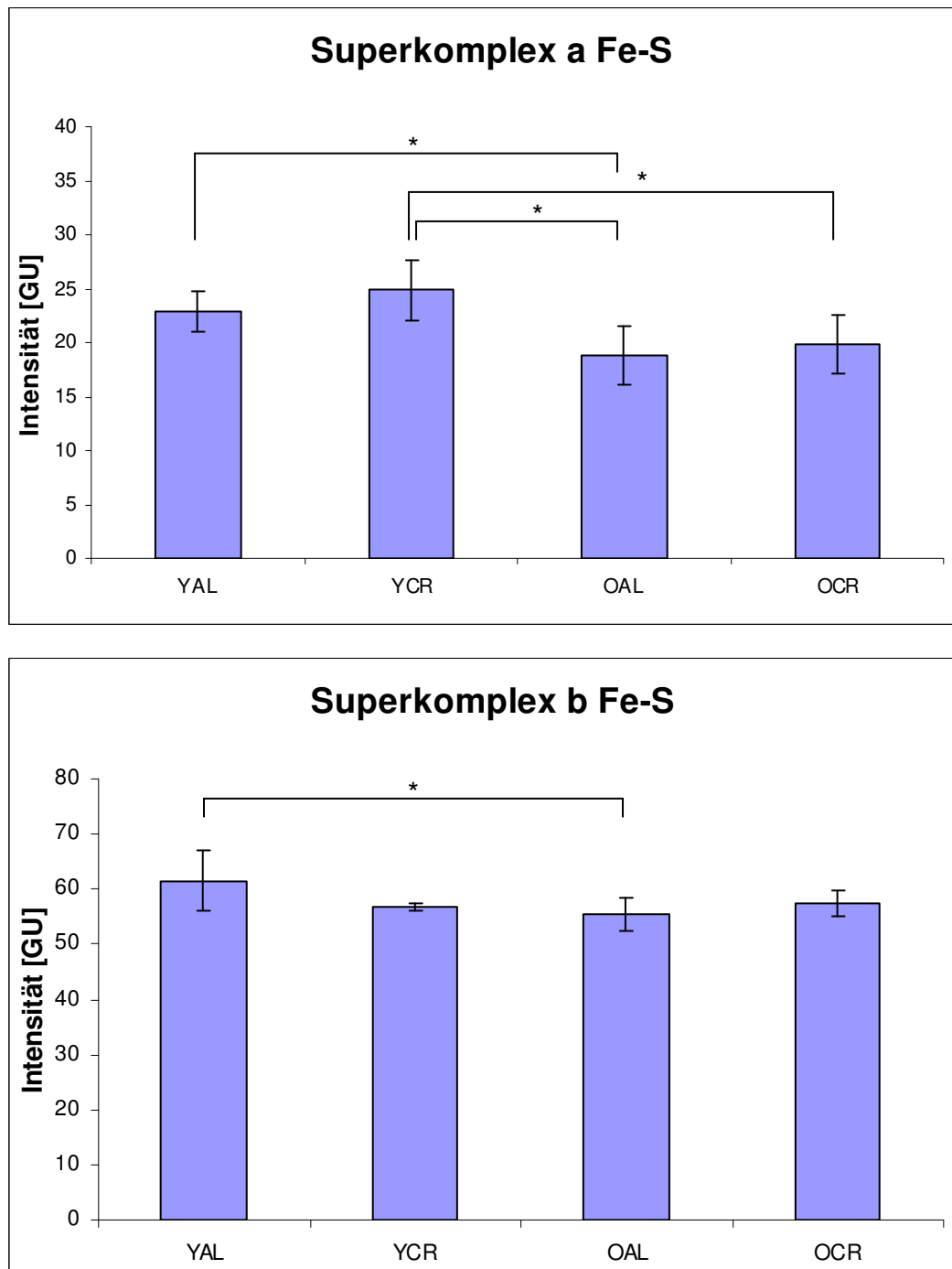
**Abb. 5.59:** Gesamtmenge der zusammen quantifizierten Superkomplexe a und b ( $I_1III_2$  und  $I_1III_2IV$ ) aus subsarcolemmalen Mitochondrien, aufgeteilt in deren im 2D-Gel detektierbare Untereinheiten (oben) und die Summe dieser (unten). Es kann unabhängig von Alter oder Kalorienrestriktion eine ähnliche stöchiometrische Verteilung der untersuchten Untereinheiten detektiert werden. Die aufsummierten Untereinheiten zeigen signifikante altersbedingte Mengenabnahmen, die für die *ad libitum* gefütterten Tiere 15% und für die Tiere mit Kalorienrestriktion 9% betragen. Eine CR-bedingte Änderung kann quasi nicht festgestellt werden, da die Mengenabnahme bei den jungen Tieren nur minimale 3% bzw. bei den alten Tieren die Mengenzunahme nur 4% beträgt. Beide Änderungen unter Kalorienrestriktion sind nicht signifikant. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )



---

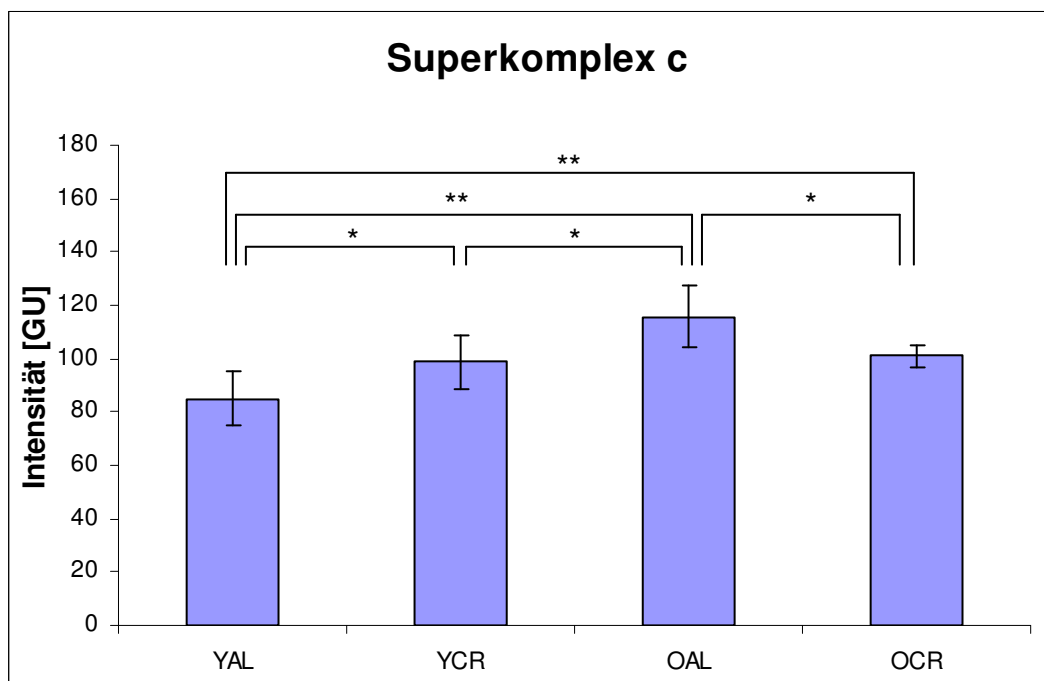
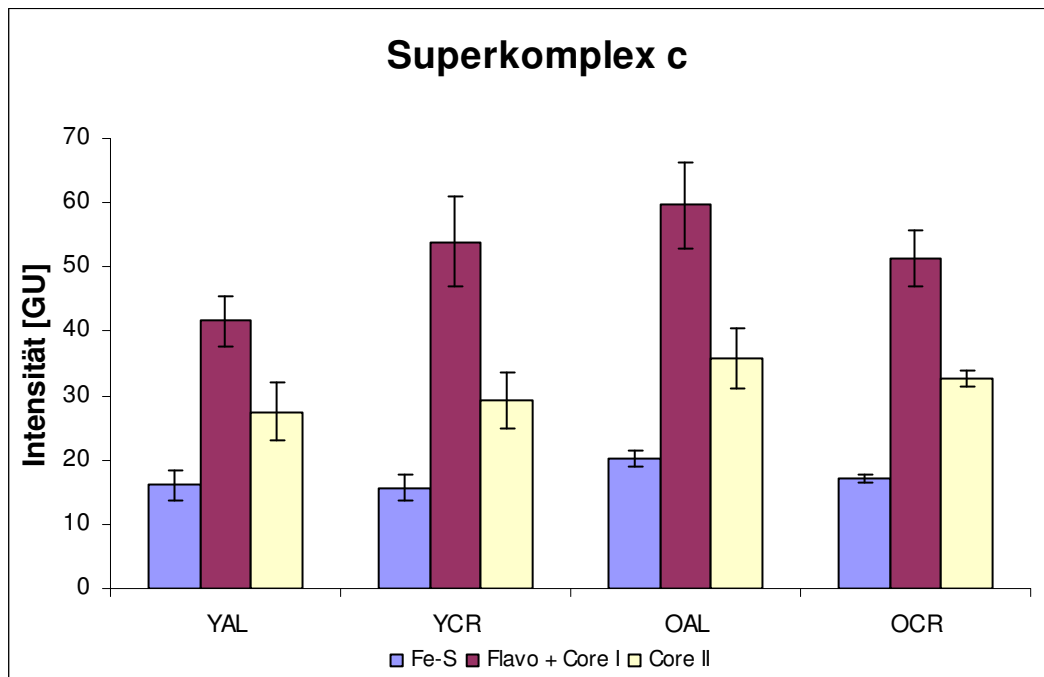
Die Gesamtmenge von Superkomplex a und b ist in Abbildung 5.59 dargestellt. Für alle Gruppen ist der gemeinsame Spot mit den Flavo- und Core I-Untereinheiten der beiden Superkomplexe derjenige, der die höchste Intensität erreicht. Zur besseren Visualisierung und dem Vergleich der Gesamtmengen zwischen den Gruppen werden alle detektierbaren Untereinheiten aufsummiert. Diese zeigen für beide Ernährungformen eine Mengenabnahme der Superkomplexe aufgrund des Alterns. Bei den *ad libitum* gefütterten Tieren ergibt sich eine Abnahme von 15%, die mit einem *p*-Wert von unter 0,01 sehr signifikant ist. Die Gruppen der Tiere mit Kalorienrestriktion zeigen eine mit einem *p*-Wert von unter 0,05 ebenfalls signifikante Abnahme von 9%. Für die beiden untersuchten Altersstufen sind jeweils nur sehr minimale Änderungen bezüglich eines Effektes der Kalorienrestriktion zu beobachten. Während sich bei den Gruppen der jungen Individuen eine kleine Mengenabnahme von 3% zeigt, kann für die beiden Gruppen der alten Tiere eine Zunahme der Gesamtmenge von Superkomplex a und b detektiert werden. Keine der CR-bedingten Änderungen erreicht einen Signifikanzwert von unter 0,05. Somit kann kein Effekt der Kalorienrestriktion bei beiden Altersstufen gefunden werden.

Für die beiden Superkomplexe a und b kann nur eine einzige Untereinheit gefunden werden, die in beiden Aggregaten vorhanden ist und die sich, wie in Abbildung 5.60 zu sehen ist, für beide Superkomplexe einzeln quantifizieren lässt. Dabei handelt es sich um die Fe-S-Untereinheit von Komplex I, die mit bis zu 25 GU für Superkomplex a und bis zu 62 GU für Superkomplex b in solch geringen Mengen vorhanden ist, dass es im 2D-Gel nur zu minimalen Überlappungseffekten kommt. Für Superkomplex a kann eine altersabhängige Mengenabnahme von 18% für die *ad libitum* gefütterten Tiere und von 20% für die Tiere mit applizierter Kalorienrestriktion detektiert werden, die beide signifikant sind. Sowohl für die jungen als auch für die alten Individuen sind minimale Erhöhungen der Intensität zu verzeichnen. Diese mit Werten von 8% bzw. 6% sehr kleinen Änderungen sind allerdings nicht signifikant. Die Mengen der Fe-S-Untereinheit in Superkomplex b zeigen für die Gruppen YCR, OAL und OCR mit Intensitäten von 55 bis 58 GU nahezu keine Veränderungen. Einzig die YAL-Gruppe zeigt mit 62 GU eine erhöhte Intensität im Vergleich zu den anderen Gruppen. Durch diese Intensitätserhöhung bei den jungen Tieren ergibt sich für die Gruppen der *ad libitum* gefütterten Individuen eine signifikante altersbedingte Abnahme der Menge von Superkomplex b von 10%. Zusätzlich zur alterbedingten Änderung kann für die jungen Tiere eine Erniedrigung von 8% detektiert werden, die jedoch nicht signifikant ist. Die Gruppen der alten Tiere zeigen mit einem Unterschied von nur 2 GU keinen auf der Kalorienrestriktion beruhenden Effekt, ebenso kann für die Tiere mit applizierter Kalorienrestriktion mit einem Unterschied von nur 1 GU keine Mengenänderung detektiert werden.



**Abb. 5.60:** Menge der Fe-S-Untereinheit von Komplex I in den Superkomplexen a ( $I_1III_2$ , oben) und b ( $I_1III_2IV$ , unten) aus subsarcolemmalen Mitochondrien. Diese kann als einzige Untereinheit für a und b getrennt quantifiziert werden. Superkomplex a zeigt signifikante altersbedingte Mengenabnahmen, die für die *ad libitum* gefütterten Tiere 18% und für die Tiere mit Kalorienrestriktion 20% betragen. Bei Superkomplex b kann für drei der vier Gruppen quasi keine Änderung in der Menge detektiert werden, einzig die Gruppe der jungen *ad libitum* gefütterten Tiere zeigt im Vergleich zu den anderen Gruppen eine größere Menge. Es ergibt sich daraus eine signifikante altersbedingte Mengenabnahme der *ad libitum* gefütterten Tiere um 10% und für die jungen Tiere eine nicht-signifikante CR-bedingte Abnahme von 8%.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )



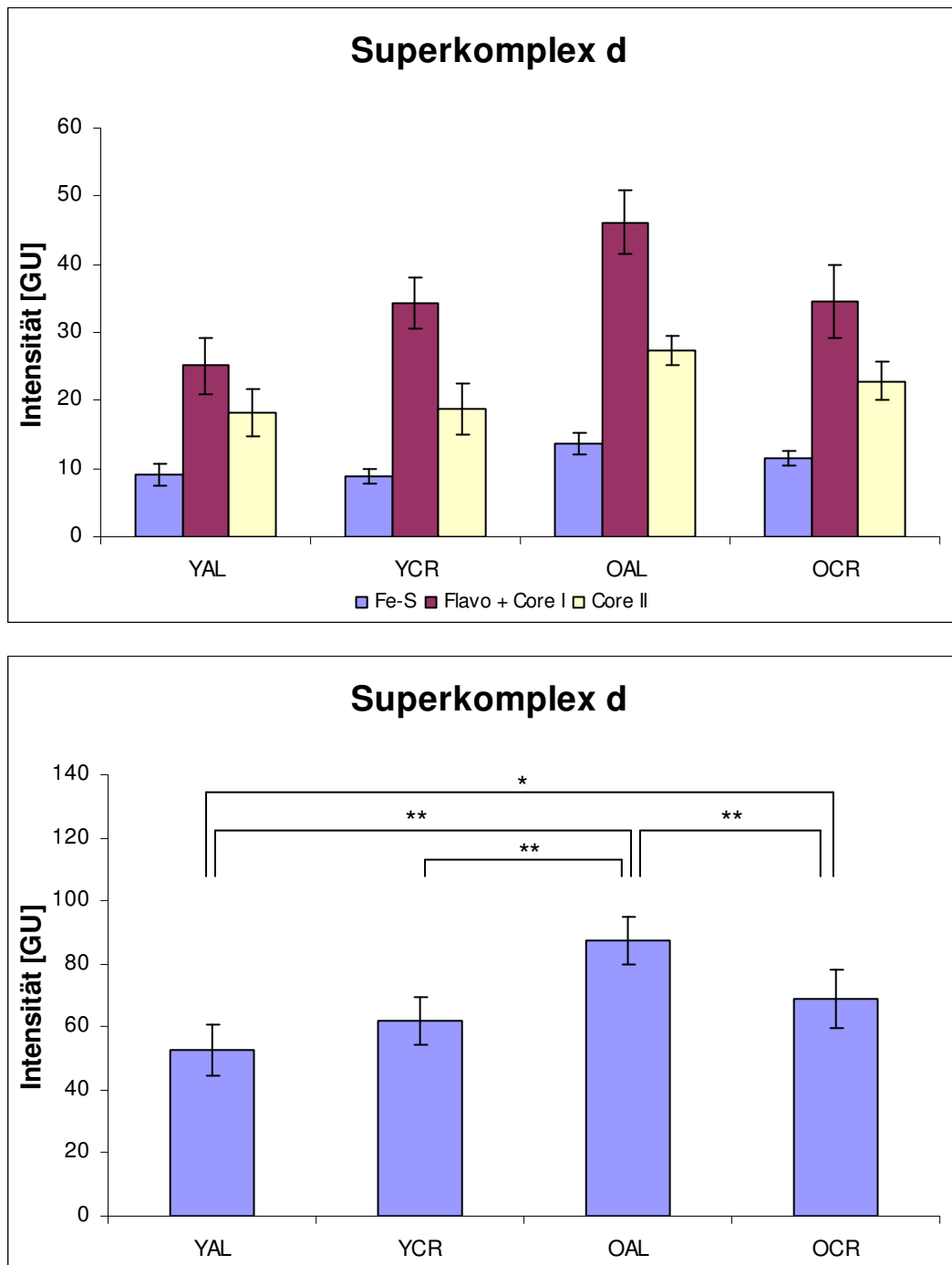
**Abb. 5.61:** Menge des Superkomplexes c ( $I_1III_2IV_2$ ) aus subsarcolemmalen Mitochondrien, aufgeteilt in dessen im 2D-Gel detektierbare Untereinheiten (oben) und deren Summe (unten). Es kann unabhängig von Alter oder Kalorienrestriktion eine vergleichbare stöchiometrische Verteilung der untersuchten Untereinheiten detektiert werden. Die aufsummierten Untereinheiten zeigen für die *ad libitum* gefütterten Tiere eine signifikante altersbedingte Zunahme der Menge um 36%, während für die Tiere mit Kalorienrestriktion mit einer Zunahme von nur 2% quasi keine Mengenänderung mit dem Alter festzustellen ist. Bei den jungen Tieren zeigt sich eine mit 16% signifikante CR-bedingte Zunahme. Im Gegensatz dazu kann für die alten Individuen eine Abnahme von ebenfalls signifikanten 13% mit applizierter Kalorienrestriktion detektiert werden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

---

Für die beiden größten auf den 2D-Gelen der subsarcolemmalen Mitochondrien aus Rattenherz detektierbaren Superkomplexe c und d können aufgrund der geringeren Menge nur noch drei Proteinspots detektiert und quantifiziert werden. Dabei handelt es sich um die Fe-S-Untereinheit von Komplex I, Core II aus Komplex III<sub>2</sub> und den gemeinsamen Spot der Komplex I-Flavo-Untereinheit und der Core I-Untereinheit von Komplex III<sub>2</sub>.

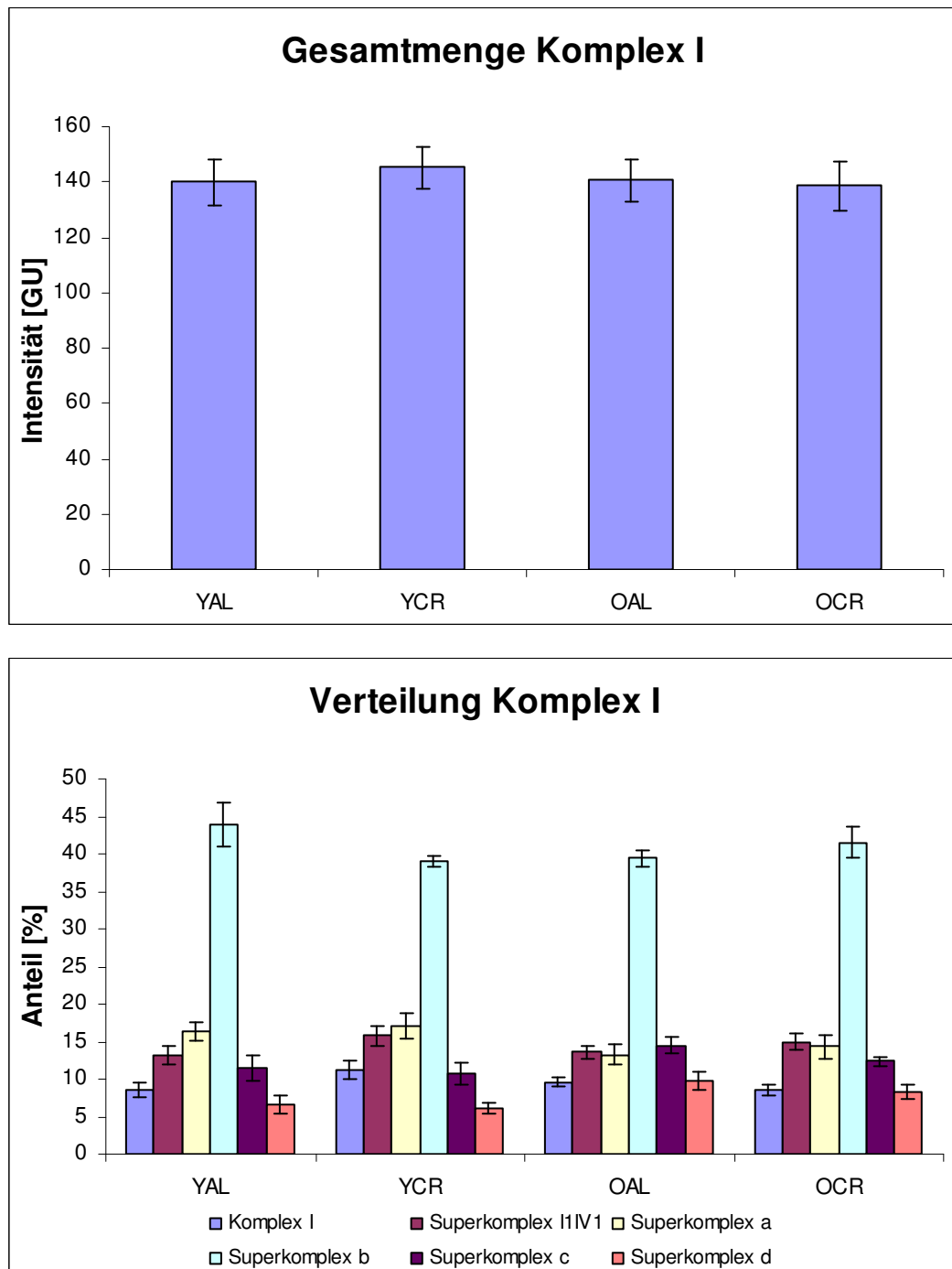
Die Änderungen der Superkomplex c-Menge, die in Abbildung 5.61 dargestellt ist, zeigen ein uneinheitliches Bild. So kann für die beiden Gruppen der *ad libitum* gefütterten Tiere eine Zunahme der Proteinmenge um 36% mit dem Alter detektiert werden, während für die Gruppen der Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, mit einer nicht-signifikanten Zunahme von 2% keine Änderung der Menge an Superkomplex c beobachtet werden kann. Die Effekte der Kalorienrestriktion unterscheiden sich für die beiden Altersgruppen. Für die jungen Tiere zeigt sich mit applizierter Kalorienrestriktion eine Erhöhung der detektierten Intensität von 16%, die mit einem *p*-Wert von unter 0,05 signifikant ist. Im Gegensatz dazu ergibt sich für die beiden Gruppen der alten Individuen eine Abnahme der Menge an Superkomplex c, die mit 13% ebenfalls eine Signifikanz mit einem *p*-Wert von unter 0,05 aufweist.

Superkomplex d zeigt, wie in Abbildung 5.62 zu erkennen, sehr ähnliche Effekte bezüglich Altern und Kalorienrestriktion wie Superkomplex c. Jedoch liegen die Intensitätswerte der aufsummierten Untereinheiten von Superkomplex d mit maximal 87 GU doch recht deutlich unter denen von Superkomplex c, für den bei den aufsummierten Untereinheiten Werte von bis zu 116 GU detektiert werden konnten. Für die *ad libitum* gefütterten Tiere ergibt sich eine altersbedingte Erhöhung der detektierten Intensität von 66%, die mit einem *p*-Wert von unter 0,01 signifikant ist. Die Individuen, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, zeigen zwar ebenso eine Erhöhung der Intensität mit dem Alter, jedoch beträgt diese nur 11% und ist mit einem *p*-Wert über 0,05 nicht signifikant. Wie auch schon für Superkomplex c detektiert werden konnte, zeigen sich ebenso für Superkomplex d sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme mit applizierter Kalorienrestriktion. Bei den Gruppen der jungen Individuen kann eine Zunahme in der Menge von Superkomplex d von 18% aufgrund der Kalorienrestriktion detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigen die Gruppen der alten Individuen eine CR-bedingte Abnahme von 21% der Superkomplex-Menge. Während die Mengenzunahme bei den jungen Tieren nicht signifikant ist, kann für die erniedrigte Intensität der OCR-Gruppe gegenüber der OAL-Gruppe eine hohe Signifikanz mit einem *p*-Wert von unter 0,01 detektiert werden.



**Abb. 5.62:** Menge des Superkomplexes d ( $I_1III_2IV_1$ ) aus subsarcolemmalen Mitochondrien, aufgeteilt in dessen im 2D-Gel detektierbare Untereinheiten (oben) und deren Summe (unten). Es kann unabhängig von Alter oder Kalorienrestriktion eine ähnliche stöchiometrische Verteilung der untersuchten Untereinheiten detektiert werden. Die aufsummierten Untereinheiten zeigen eine altersbedingte Mengenzunahme, die bei den *ad libitum* gefütterten Tieren bei signifikanten 66% und bei den Tieren mit Kalorienrestriktion bei nicht-signifikanten 11% liegt. Bei den jungen Tieren zeigt sich eine CR-bedingte Zunahme von 18%, die nicht signifikant ist. Im Gegensatz dazu kann für die alten Individuen eine Abnahme von signifikanten 21% mit applizierter Kalorienrestriktion detektiert werden.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )



**Abb. 5.63:** Gesamtmenge (oben) und Verteilung (unten) der Fe-S-Untereinheit von Komplex I auf den individuellen Komplex und die detektierten Komplex I-enthaltenden Superkomplexe aus subsarcolemmalen Mitochondrien. Für die Gesamtmenge von Komplex I kann keine signifikante Mengenänderung zwischen den untersuchten Gruppen detektiert werden. Bei deren Verteilung ist deutlich zu sehen, dass Superkomplex b derjenige ist, der bei allen Gruppen mit Abstand den größten Anteil an der Gesamtmenge von Komplex I hat. Des Weiteren ist zu erkennen, dass Komplex I zu maximal nur 11% als individueller Komplex vorliegt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen.

---

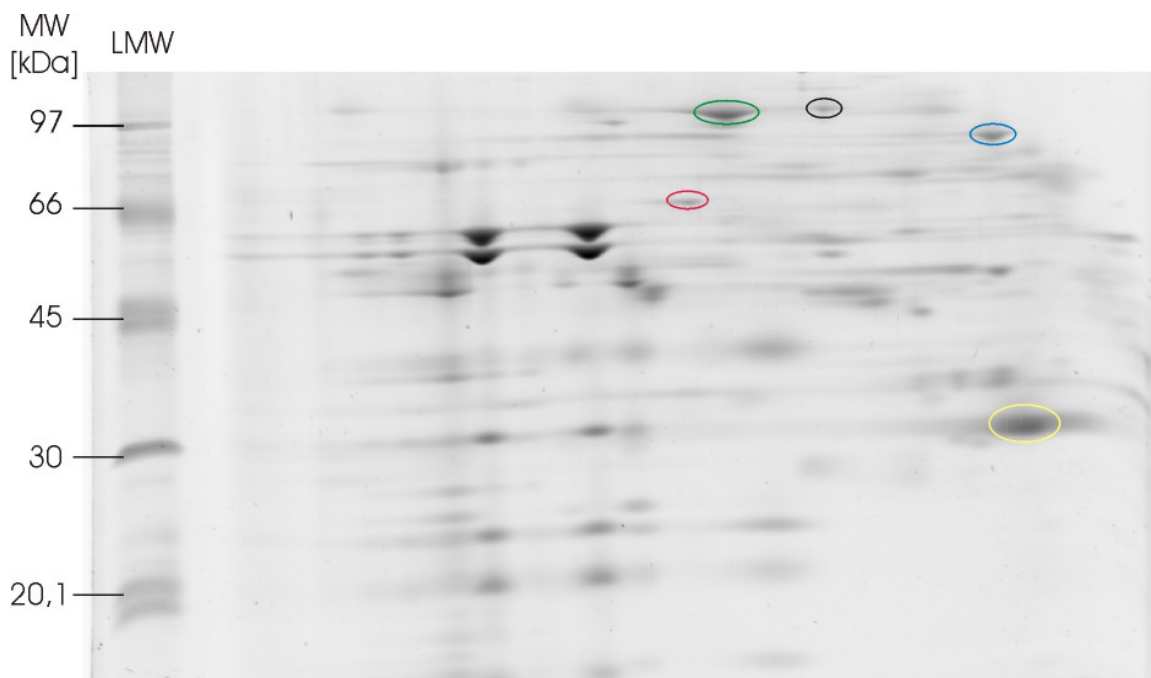
Da die Fe-S-Untereinheit von Komplex I sowohl für den individuellen Komplex als auch für alle Komplex I-enthaltenden Superkomplexe quantifiziert werden kann, ist es möglich, die Verteilung von Komplex I auf seine verschiedenen Formen zu untersuchen. Diese Verteilung ist von Interesse, da bisher für verschiedene Gewebe gezeigt werden konnte, dass Komplex I nur zu einem recht geringen Anteil als individueller Komplex vorkommt und zum größten Teil mit anderen Komplexen zu einem Superkomplex assoziiert vorliegt. So wurde in Rinderherzmitochondrien ein Anteil von nur 14-16% an individuellem Komplex I gefunden<sup>[153]</sup>, während für Rattenhirnmitochondrien sogar nur ein Anteil von etwa 5% detektiert werden konnte<sup>[93, 103]</sup>.

Abbildung 5.63 zeigt die Gesamtmenge der Fe-S-Untereinheit von Komplex I und deren Verteilung auf den individuellen Komplex und die Komplex I-enthaltenden detektierten Superkomplexe. Die Gesamtmenge von Komplex I zeigt keine signifikanten Veränderungen, weder mit dem Alter, noch aufgrund der applizierten Kalorienrestriktion (Abb. 5.63 oben). Komplex I kann neben dem Auftreten als individueller Komplex zu fünf verschiedenen Superkomplexen assoziiert vorliegen. Das auffälligste Merkmal der Verteilung auf die detektierbaren sechs möglichen Formen, in der Komplex I vorliegen kann, ist der extrem hohe Anteil an Superkomplex b, der zwischen 39% und 44% der Gesamtmenge des Fe-S-Proteins ausmacht (Abb. 5.63 unten). Des Weiteren ist deutlich zu erkennen, dass nur zwischen 8,6% und 11,2% von Komplex I als individueller Komplex vorliegen. Das bedeutet im Gegenzug, dass bis zu 91,4 % des detektierbaren Komplexes I mit anderen Atmungskettenkomplexen zu Superkomplexen assoziiert vorkommt. Die *ad libitum* gefütterten Tiere zeigen mit dem Alter eine deutlich veränderte Verteilung der Komplex I-Gesamtmenge. So steigt mit dem Alter der Anteil des individuellen Komplexes von 8,6% um einen Prozentpunkt auf 9,6%. Gleichzeitig kann eine deutliche Abnahme des Anteils von Superkomplex b von etwa 4 Prozentpunkten auf nur noch 39% detektiert werden. Damit scheint eine Verschiebung der kleineren Superkomplexe wie a und b hin zu größeren Superkomplexen einherzugehen. Während für die jungen Tiere noch ein Anteil von insgesamt ca. 18% auf die beiden größten Superkomplexe c und d entfällt, beträgt die Summe der Anteile dieser beiden Superkomplexe bei den alten Tieren ca. 24,5%. Diese Tendenz ist ebenso bei den Tieren mit applizierter Kalorienrestriktion zu beobachten. Die jungen Individuen besitzen einen Anteil von knapp 17%, während bei den alten Individuen ca. 20,5% von Komplex I zu den Superkomplexen c und d assoziiert vorliegen. Im Gegensatz zum gesteigerten Anteil von individuellem Komplex durch das Altern bei den normal gefütterten Tieren, kann für die Ratten, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, eine Abnahme des Anteils von individuellem Komplex I beobachtet werden. Dieser sinkt von 11,2% bei der YCR-Gruppe auf nur noch 8,6% bei der OCR-Gruppe. Bei den jungen Tieren zeigt sich mit applizierter Kalorienrestriktion eine deutliche Abnahme des Anteils von

Superkomplex b von knapp 44% auf nur noch 39%, die in einer Erhöhung der Anteile der kleineren Superkomplexe a und b und des individuellen Komplexes resultiert. Diese Art von Verschiebung ist für die alten Tiere nicht zu beobachten. Hier bedingt die Kalorienrestriktion eine leichte Erhöhung des Superkomplex b-Anteils und gleichzeitig eine leichte Abnahme der größten Superkomplexe c und d. Generell lassen sich sowohl mit dem Alter als auch mit applizierter Kalorienrestriktion keine extremen Änderungen der Verteilung auf die verschiedenen Formen, in denen Komplex I vorliegen kann, feststellen.

#### 5.5.1.4 Nicht-OxPhos-Proteine

Neben den zu den Atmungskettenkomplexen und –superkomplexen gehörenden Protein-Untereinheiten können in den 2D-BN/SDS-Gelen der subsarcolemmalen Mitochondrien auch andere mitochondriale Proteine identifiziert und quantifiziert werden. In dieser Arbeit handelt es sich dabei um HSP60, die Enzyme Aconitase, Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase und Oxoglutarat-Dehydrogenase und die ADP/ATP-Translokase 1, die zur Familie der ‚Solute Carrier‘ gehört. Die Lage dieser Proteine in den für diese Arbeit hergestellten Gelen ist in Abbildung 5.64 gezeigt.



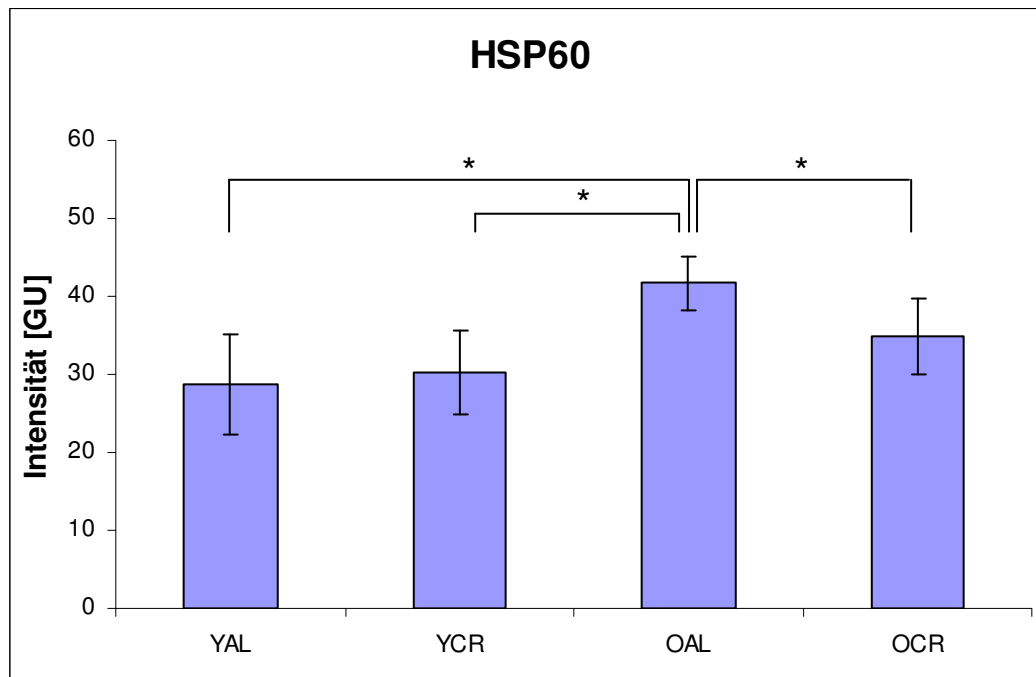
**Abb. 5.64:** Ausschnitt eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby gefärbten 2D-Gels der untersuchten subsarcolemmalen Mitochondrien aus Rattenherz. Die markierten Proteinspots zeigen die quantifizierten mitochondrialen Proteine, die nicht zur oxidativen Phosphorylierung gehören. Bei diesen Proteinen handelt es sich um HSP60 (rot), Aconitase (blau), Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase (grün), Oxoglutarat-Dehydrogenase (schwarz) und die ADP/ATP-Translokase 1 (gelb).



---

Das Hitzeschockprotein 60, kurz **HSP60**, ist ein Chaperon, das seinen Namen seiner molekularen Masse von 60 kDa verdankt. In Zellen liegt es in der Matrix der Mitochondrien vor und kann in nativen Gelen als Heptamer mit einer Masse von etwa 420 kDa detektiert werden<sup>[92, 93, 103, 104]</sup>. Die Monomere lagern sich für die Bildung des Heptamers spezifisch zu einer Fass-Struktur zusammen. Mittlerweile konnte ebenfalls eine cytoplasmatische Variante des HSP60-Proteins gefunden werden, welches bis auf eine 26 Aminosäuren lange Sequenz am N-Terminus mit dem mitochondrialen Vertreter des HSP60-Proteins nahezu identisch ist<sup>[157]</sup>. HSP60 besitzt die Funktion, wie bei allen Chaperonen üblich, die korrekte Faltung von Proteinen durch Wechselwirkung mit diesen zu ermöglichen. Auf diese Weise können Chaperone die Bildung von unspezifischen Proteinaggregaten verhindern, indem sie an ungefaltete Bereiche von fertigen oder noch in der Synthese befindlichen Polypeptiden binden und die korrekte Konformation stabilisieren. Zudem ist HSP60 am Transport von Proteinen durch die innere Mitochondrienmembran in die Matrix beteiligt, indem es die Proteine währenddessen in einem ungefalteten Zustand hält<sup>[158]</sup>. Neuere Ergebnisse zeigen, dass Zellen, die verschiedenen Formen von Stress ausgesetzt sind, mit einer erhöhten Expressionsrate von HSP60 reagieren. Dies führt zu der Annahme, dass HSP60 vermutlich einen Teil eines grundlegenden Mechanismus darstellt, der die Abwehr von durch ROS und RNS ausgelösten neurotoxischen Störungen aufgrund von Altern und neurodegenerativen Erkrankungen vermittelt<sup>[159]</sup>. Fehlt HSP60 aufgrund von Mutationen des Gens in der nukleären DNA, treten schwerwiegende Erkrankungen auf. So können die erblichen Krankheiten der spastischen Spinalparalyse und die Leukodystrophie auf Mutationen des HSP60-codierenden Gens zurückgeführt werden<sup>[160, 161]</sup>.

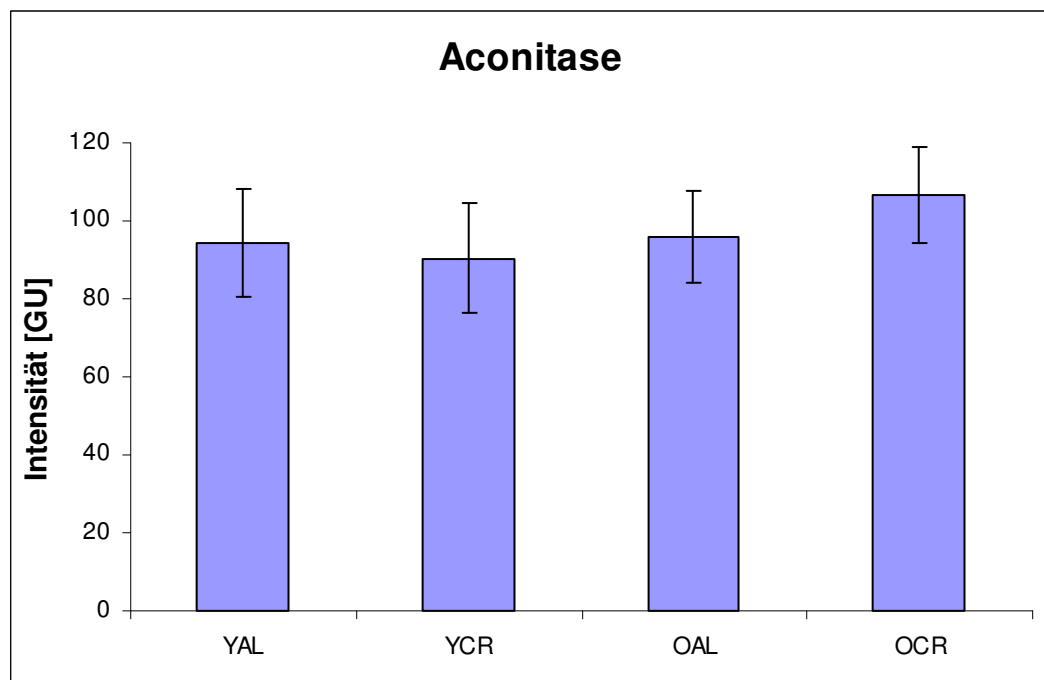
Die detektierten Mengen für HSP60 in subsarcolemmalen Mitochondrien aus Rattenherz sind in Abbildung 5.65 dargestellt. Es zeigt sich bei beiden Ernährungsformen eine Zunahme der HSP60-Menge mit dem Alter. Für die *ad libitum* gefütterten Tiere beträgt die Erhöhung der detektierten Intensität, die mit der Proteinmenge gleichgesetzt werden kann, signifikante 45%, während diese für die Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, nur nicht-signifikante 16% beträgt. Ein uneinheitliches Bild zeigt sich in Bezug auf die CR-bedingten Änderungen der HSP60-Menge. Für die jungen Tiere kann eine mit 5% minimale, nicht-signifikante Mengenzunahme detektiert werden. Aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen der jungen Individuen und der nur minimalen Änderung zwischen den beiden Gruppen, kann man sagen, dass die beiden Gruppen quasi die gleiche Menge an HSP60 zeigen. Ganz anders sieht es bei den beiden Gruppen der alten Individuen aus. Hier ist eine Mengenabnahme von 16% zu beobachten, die mit einem *p*-Wert von unter 0,05 signifikant ist.



**Abb. 5.65:** Menge von mitochondrialem HSP60 aus subsarcolemmalen Mitochondrien in den untersuchten Gruppen der jungen und alten Ratten. Es zeigt sich eine altersbedingte Mengenzunahme, die bei den *ad libitum* gefütterten Tieren bei signifikanten 45% und bei den Tieren mit Kalorienrestriktion bei nicht-signifikanten 16% liegt. Bei den jungen Tieren zeigt sich eine minimale CR-bedingte Zunahme von 5%, die nicht signifikant ist. Im Gegensatz dazu kann für die alten Individuen eine Abnahme von signifikanten 16% mit applizierter Kalorienrestriktion detektiert werden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

Die **Aconitase** ist ein Schlüsselenzym des Citratzyklus, der in der mitochondrialen Matrix abläuft. Auch hier gibt es ähnlich wie bei HSP60 eine cytosolische und eine mitochondriale Variante des Enzyms, die als Aconitase 1 und 2 bezeichnet werden. Bei der in dieser Arbeit quantifizierten Aconitase handelt es sich um die mitochondriale Variante des Enzyms, die Aconitase 2. Diese hat eine molare Masse von ca. 90 kDa und katalysiert die Reaktion von Citrat über das Zwischenprodukt cis-Aconitat zu Isocitrat. Der Citratzyklus ist die Grundlage der Energieproduktion von Zellen. Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, wird decarboxyliert und als Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust. Durch Bindung des Acetyl-Restes an Oxalacetat entsteht Citrat, das durch die Aconitase umgesetzt wird. Im weiteren Verlauf des Zyklus werden 2 Moleküle  $\text{CO}_2$  von Zyklus-Zwischenprodukten abgespalten, ein Molekül GTP (Guanosin-5'-Triphosphat) gebildet, drei  $\text{NAD}^+$ -Moleküle zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und ein FAD-Molekül zu  $\text{FADH}_2$  reduziert. Die bei der Reoxidation von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  freigesetzten Elektronen werden in die Reaktionskette der oxidativen Phosphorylierung eingeschleust und erzeugen durch ihren Transport über die Atmungskettenkomplexe den für die ATP-Synthese essentiellen elektrochemischen

Protonengradienten. Eine Mutation des Eisen-Schwefel-Cluster-Gerüstproteins (ISCU), das essentiell für Assemblierung der Eisen-Schwefel-Cluster in der Aconitase ist, kann zu der seltenen Krankheit Aconitasemangel führen, die sich durch Myopathie und Bewegungsstörungen äußert<sup>[162, 163]</sup>. Diese schwerwiegende Krankheit kann bis heute nicht medikamentös behandelt werden.



**Abb. 5.66:** Menge von mitochondrialer Aconitase aus subsarcolemmalen Mitochondrien in den untersuchten Gruppen der jungen und alten Ratten. Es zeigen sich mit Intensitätswerten zwischen 90 und 107 GU keine Änderungen, die mit einem  $p$ -Wert von unter 0,05 eine Signifikanz aufweisen. Bei den *ad libitum* gefütterten Tieren kann mit einer Erhöhung um 2 GU quasi keine Veränderung in der Menge detektiert werden. Einzig die Tiere mit Kalorienrestriktion zeigen eine Mengenzunahme von 18% mit dem Alter. Aufgrund der erhöhten Proteinmenge der OCR-Gruppe ergibt sich eine CR-bedingte Zunahme von 11% bei den alten Tieren, während für die jungen Individuen quasi keine Änderung der Menge detektiert werden kann.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen.

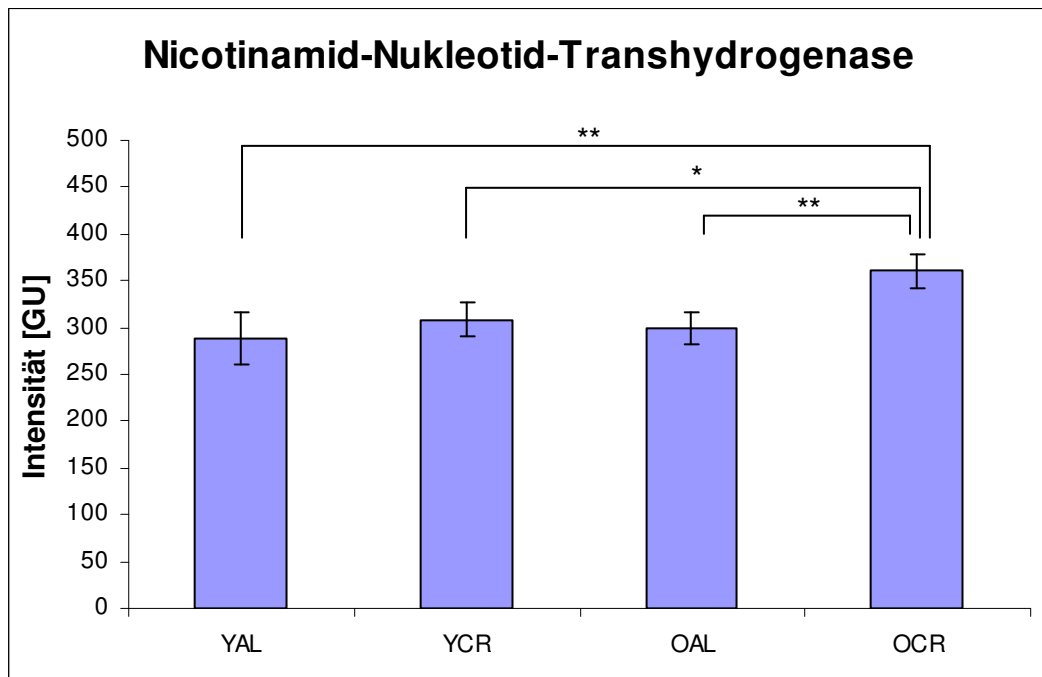
Die Menge an detektierbarer Aconitase in subsarcolemmalen Mitochondrien aus Rattenherz ist in Abbildung 5.66 dargestellt. Es zeigt sich, dass die Gruppen der jungen Individuen und die der alten *ad libitum* gefütterten Tiere mit Intensitäten zwischen 90 und 96 GU kaum Änderungen aufweisen. Einzig die OCR-Gruppe zeigt mit 106 GU eine leichte Intensitätszunahme gegenüber den anderen Gruppen. Durch diese Erhöhung ergibt sich für die Tiere mit Kalorienrestriktion eine altersbedingte Zunahme der Aconitase-Menge von 18%. Für die alten Tiere bedeutet dies ebenfalls eine Mengenzunahme von 11% mit applizierter Kalorienrestriktion. Sowohl der Vergleich der jungen Tiere als auch der Vergleich der *ad*

---

*libitum* gefütterten Tiere zeigen aufgrund der nur minimalen Abweichungen in der Intensität quasi keine Veränderungen mit applizierter Kalorienrestriktion bzw. mit dem Alter. Jegliche detektierbaren Änderungen zwischen den untersuchten Gruppen zeigen mit *p*-Werten von weit über 0,05 keine Signifikanz.

Bei der **Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase** handelt es sich um ein in der inneren Mitochondrienmembran vorkommendes Enzym, das zur Aufrechterhaltung des Protonengradienten beiträgt. Es katalysiert reversibel die Reaktion der Edukte NADH und NADP durch Übertragung eines Hydridions zu den Produkten NAD und NADPH. Die Größe der protonenmotorischen Kraft beeinflusst die Affinität des Enzyms zu seinen beiden Substraten und die Transferrate der Hydridionen. Unter physiologischen Bedingungen liegt das Gleichgewicht auf der Seite von NADPH<sup>[164]</sup>, welches für die Biosynthese und die Aufrechterhaltung des Levels an reduziertem Glutathion gebraucht wird. Bei der Übertragung des Hydridions werden zwei Protonen über die innere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum transloziert. Ist der Protonengradient zu schwach ausgeprägt, verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung NADH. Durch diese umgekehrte Reaktion stehen weitere Reduktionsäquivalente für die Atmungskette zur Verfügung und der Protonengradient kann dadurch wieder aufgebaut werden<sup>[164]</sup>.

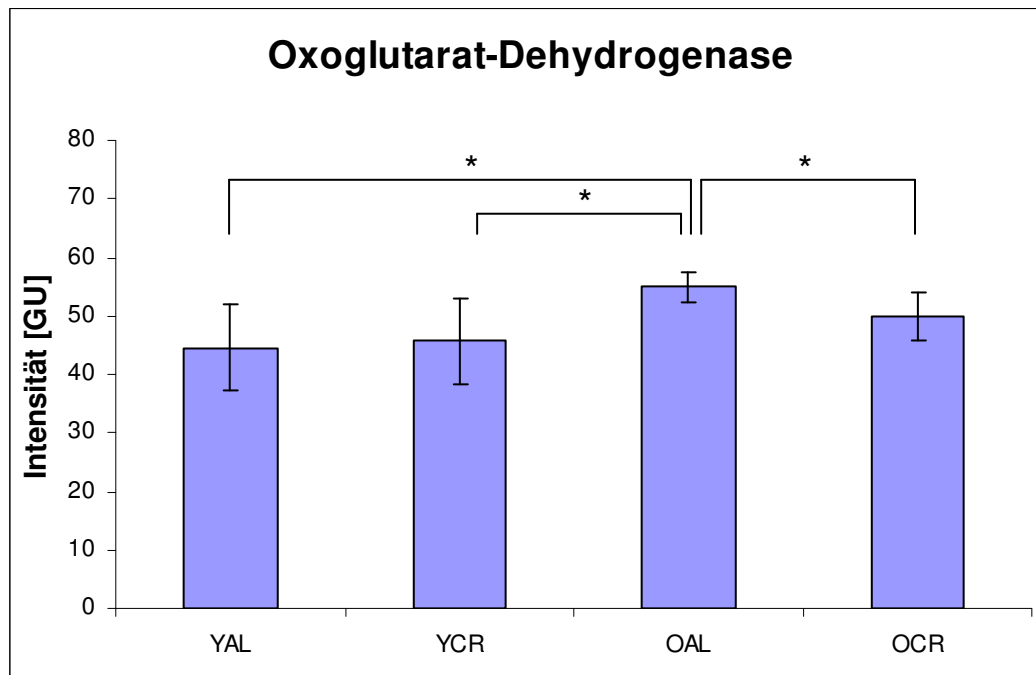
Die Menge der Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase in den untersuchten Gruppen ist in Abbildung 5.67 dargestellt. Der Vergleich der Gruppen zeigt, dass sich die Menge des Enzyms für die beiden Gruppen der jungen Tiere und die der alten, *ad libitum* gefütterten Individuen sich mit Intensitätswerten zwischen 288 und 309 GU kaum verändert. Diese minimalen Unterschiede sind nicht signifikant, sodass quasi keine Mengenänderung zwischen diesen Gruppen vorliegt. Wie auch schon für die Aconitase kann nur für die OCR-Gruppe eine im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöhte Intensität der Grauwerte detektiert werden. Diese resultiert in einer altersbedingten Mengenzunahme der Tiere mit Kalorienrestriktion von 16% und in einer CR-bedingten Zunahme der alten Tiere von 20%. Beide detektierten Mengenzunahmen der Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase zeigen mit *p*-Werten von unter 0,01 eine hohe Signifikanz.



**Abb. 5.67:** Menge von mitochondrialer Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase aus subsarcolemmalen Mitochondrien in den untersuchten Gruppen der jungen und alten Ratten. Es zeigen sich für die drei Gruppen YAL, YCR und OAL keine Änderungen in der Menge, die mit einem  $p$ -Wert von unter 0,05 eine Signifikanz aufweisen. Einzig die OCR-Gruppe zeigt eine signifikant erhöhte Menge des Enzyms, die in einer Zunahme von 16% im Vergleich mit der YCR-Gruppe und 20% im Vergleich mit der OAL-Gruppe resultiert.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

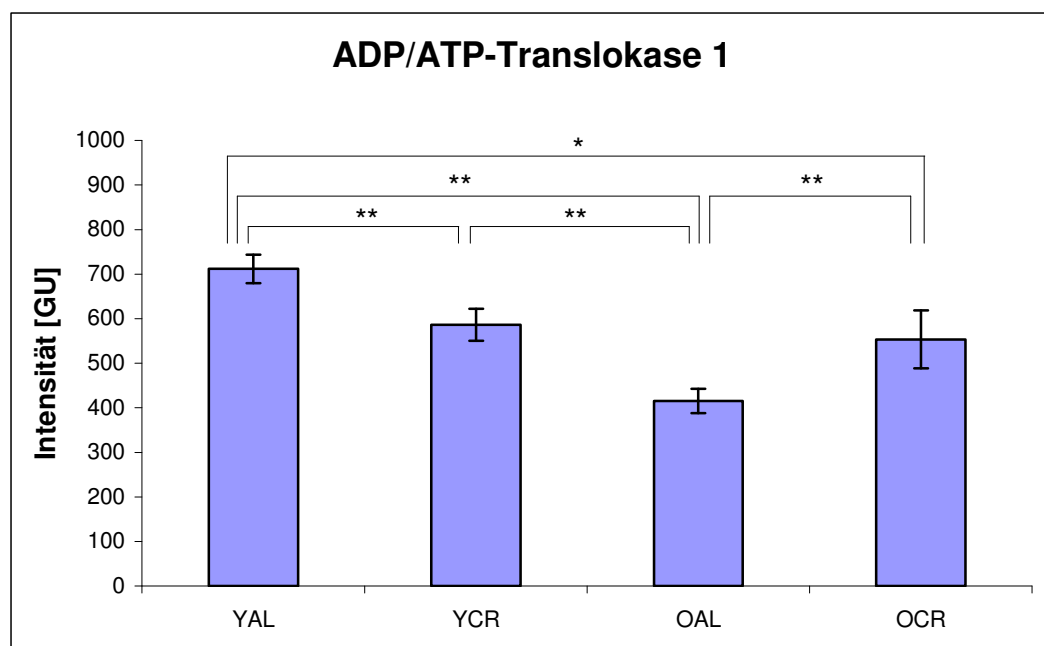
Die **Oxoglutarat-Dehydrogenase**, auch  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase genannt, ist ein wichtiges Enzym des Citratcyclus mit einer molaren Masse von 105 kDa. Sie liegt unter physiologischen Bedingungen mit zwei weiteren Enzymen, der Dihydrolipoamid-Succinyltransferase und der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase, zu einem Multi-Enzymkomplex assoziiert vor, welcher die Reaktion von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA katalysiert. Zuerst wird  $\alpha$ -Ketoglutarat decarboxyliert und anschließend auf Co-Enzym A transferiert. Dabei wird NAD zu NADH reduziert, welches als Reduktionsäquivalent in die Atmungskette eingeschleust wird. Der Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex weist sowohl strukturelle als auch funktionelle Ähnlichkeiten zum Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex auf, der die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA unter Abspaltung von  $\text{CO}_2$  und Generierung von NADH katalysiert. Beide Multi-Enzymkomplexe nutzen für die Reaktionen, die sie durchführen, die gleichen Co-Faktoren und sehr ähnliche Reaktionsmechanismen.



**Abb. 5.68:** Menge der Oxoglutarat-Dehydrogenase aus subsarcolemmalen Mitochondrien in den untersuchten Gruppen der jungen und alten Ratten. Es zeigen sich für die beiden Gruppen der jungen Tiere kaum Unterschiede in der Menge und damit quasi keine Änderungen, die mit einem  $p$ -Wert von unter 0,05 eine Signifikanz aufweisen. Für die OCR-Gruppe kann nur eine minimale nicht-signifikante Mengenzunahme detektiert werden. Einzig die OAL-Gruppe zeigt eine signifikant erhöhte Menge des Enzyms, die in einer alternsbedingten Zunahme von 23% der *ad libitum* gefütterten Tiere und in einer CR-bedingten Mengenabnahme von 9% der alten Tiere resultiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

Die Oxoglutarat-Dehydrogenase des Multi-Enzymkomplexes kann auch in den 2D-Gelen der subsarcolemmalen Mitochondrien detektiert und quantifiziert werden. Die Mengen des Enzyms sind in Abbildung 5.68 dargestellt. Es zeigt sich bei den beiden Gruppen der jungen Tiere mit einem Unterschied von nur einer GU bei einer Gesamtintensität von 45 und 46 GU quasi keine Änderung in der Menge der Oxoglutarat-Dehydrogenase. Für die Gruppe der alten Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurde, kann mit einer Intensität von 50 GU nur eine minimale CR-bedingte Mengenzunahme von 9% detektiert werden, die allerdings nicht signifikant ist. Einzig die OAL-Gruppe zeigt mit einer Gesamtintensität von 55 GU eine etwas deutlichere Zunahme der Enzymmenge, die im Vergleich mit den anderen drei Gruppen mit einem  $p$ -Wert von unter 0,05 signifikant ist. Durch diese Erhöhung ergibt sich für die *ad libitum* gefütterten Tiere eine signifikante alternsbedingte Mengenzunahme von 23%. Während für die beiden Gruppen der jungen Individuen quasi keine CR-bedingte Änderung der Oxoglutarat-Dehydrogenase-Menge detektiert werden konnte, zeigt sich aufgrund der hohen Intensität der OAL-Gruppe für die beiden Gruppen der alten Individuen eine signifikante Abnahme der Menge von 9% mit applizierter Kalorienrestriktion.

Die **ADP/ATP-Translokase 1** kann über MALDI-Massenspektrometrie mittels PMF als Solute Carrier Family 25 Member 4 identifiziert werden<sup>[93]</sup>. Bei der Gruppe der Solute Carrier handelt es sich um eine große Gruppe von membranintegralen Transportproteinen. Dieser Gruppe gehören über 300 Proteine an, die in 51 Familien organisiert sind. Die Familie 25, zu der auch die ADP/ATP-Translokase 1 gehört, ist ausschließlich in den Mitochondrienmembranen zu finden. Die ADP/ATP-Translokase selbst ist ein Antiporter, der ATP aus der Matrix in das Cytosol transportiert und gleichzeitig ADP aus dem Cytosol in die Matrix einschleust. Das Enzym ist damit essentiell für die Zelle, da das in den Mitochondrien produzierte ATP ohne die Translokase nicht an die Orte in der Zelle transportiert werden könnte, wo Energie verbraucht wird. Die ADP/ATP-Translokase liegt nativ als Homodimer mit einer Masse von ca. 60 kDa vor<sup>[165]</sup>, das eine Fass-Struktur in der inneren Mitochondrienmembran ausbildet. Aufgrund der besonderen Rolle der ADP/ATP-Translokase für die Zelle ist es nicht verwunderlich, dass sie in sehr hohen Mengen in der Membran vorkommt. Es konnte gezeigt werden, dass die ADP/ATP-Translokase bis zu 10% aller in der inneren Mitochondrienmembran vorkommenden Proteine ausmacht<sup>[166]</sup>.



**Abb. 5.69:** Menge der ADP/ATP-Translokase 1 aus subsarcolemmalen Mitochondrien, ein Protein der Solute Carrier Family 25, in den untersuchten Gruppen der jungen und alten Ratten. Die *ad libitum* gefütterten Tiere zeigen eine signifikante altersbedingte Abnahme in der Menge von 42%, während die Tiere mit Kalorienrestriktion mit einer Abnahme von 6% quasi keine Veränderung zeigen. Bei den jungen Tieren lässt sich eine CR-bedingte Mengenabnahme von 20% detektieren, während sich für die alten Tiere eine Zunahme der Menge mit Kalorienrestriktion von 33% beobachten lässt. Beide detektierten Änderungen sind höchst signifikant.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

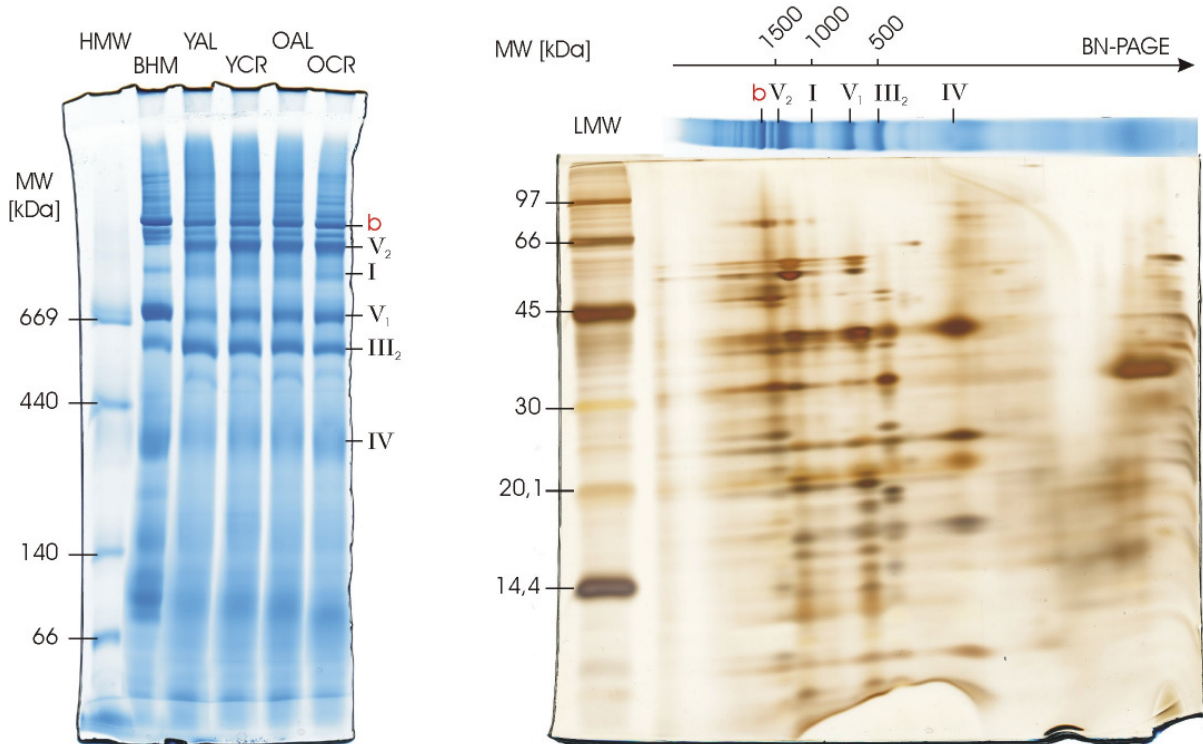
---

Die quantifizierte Menge der ADP/ATP-Translokase 1 zeigt, wie in Abbildung 5.69 dargestellt, ein sehr uneinheitliches Bild bezüglich der Effekte von Altern und Kalorienrestriktion. Es kann sowohl für die *ad libitum* gefütterten Tiere als auch für die Tiere mit applizierter Kalorienrestriktion eine altersbedingte Mengenabnahme der Translokase detektiert werden. Diese Abnahme beträgt für die AL-Gruppen höchst signifikante 42%, während bei den CR-Gruppen nur eine Abnahme von 6% beobachtet werden kann, die nicht signifikant ist. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass die CR-Tiere quasi keine altersbedingten Änderungen zeigen. Die jungen Tiere zeigen eine signifikante Mengenabnahme von 20% mit applizierter Kalorienrestriktion, während für die alten Individuen gegensätzlich zu den jungen Tieren eine Zunahme der ADP/ATP-Translokase-Menge von 33% detektiert werden kann. Beide Änderungen sind mit p-Werten unter 0,01 signifikant.

### 5.5.2 Interfibrilläre Mitochondrien aus Herz

Die interfibrillären Mitochondrien aus Rattenherz konnten nur unter Zuhilfenahme einer bakteriellen Protease isoliert werden, da diese Mitochondrienspezies zwischen den Muskelfibrillen lokalisiert ist und damit bei herkömmlichen Homogenisierungsmethoden von Gewebe nur schlecht bzw. gar nicht zugänglich ist<sup>[76]</sup>. Sollen diese jedoch ebenfalls isoliert werden, müssen die schützenden Muskelfibrillen abgebaut werden. Da dieses aufgrund der Festigkeit der Fibrillen kaum durch mechanischen Aufschluss ohne eine gleichzeitige Zerstörung der Mitochondrien gelingt, müssen die Muskelfibrillen durch eine Protease verdaut werden. In früheren Arbeiten wurde dazu häufig das Enzym Nagarse verwendet, welches die Muskelfibrillen verdaut und damit die Mitochondrien freilegt<sup>[76]</sup>. Da dieses Enzym mittlerweile nicht mehr kommerziell erhältlich ist<sup>[167]</sup>, wurde eine andere Protease gewählt (Proteinase, bacterial, Type XXIV; Sigma P8038), die ebenfalls wie die Nagarse bei Mitochondrienisolierungen eingesetzt werden kann<sup>[108]</sup>. Um eine Degradation der Mitochondrien durch das Enzym zu verhindern, wird es nur für kurze Zeit zur homogenisierten Probe, die das Zelltrümmersediment aus der Isolierung von subsarcolemmalen Mitochondrien darstellt, hinzugegeben und anschließend durch einen Zentrifugationsschritt im Überstand gesammelt und mit diesem verworfen (siehe Kapitel 4.1.3.2). Jedoch zeigen die Tests mit Rinderherzmitochondrien in Kapitel 5.3, dass sich offenbar nach der Isolierung der interfibrillären Mitochondrien, trotz des Zentrifugationsschrittes zur Entfernung des Enzyms, dieses noch in geringen Mengen in der Probe vorhanden ist. Dies führt bei SDS-Gelelektrophoresen wie bei der 2. Dimension





**Abb. 5.70:** BN-Gel (links) und 2D-Gel (rechts, OCR-Gruppe) der untersuchten interfibrillären Mitochondrien aus Rattenherz. Die Solubilisierung erfolgte mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 4 g/g, aufgetragen wurden 80 µg Protein vor Solubilisierung beim BN-Gel und 110 µg für das 2D-Gel. Die Spuren der gepoolten Proben weisen keine Veränderungen zu anderen Proben auf, die nicht mit der Protease behandelt wurden. Das 2D-Gel zeigt allerdings besonders im niedrigen Molekularmassenbereich der ersten Dimension eine partielle Degradation der Proteine. Während der Solubilisierung und in allen weiteren verwendeten Lösungen und Puffern, die mit der Probe in Kontakt kamen, wurde PMSF in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. Individuelle Komplexe sind in schwarz dargestellt, Superkomplexe in rot.

der 2D-BN/SDS-PAGE zu einer erneuten Aktivierung des Enzyms und damit zu einer Degradation der mitochondrialen Proteine. Um dies zu verhindern, wurde bei allen Schritten der Probenaufbereitung zu den verwendeten Lösungen und Puffern der Protease-Inhibitor PMSF mit einer Endkonzentration von 1 mM hinzugegeben. Nichtsdestotrotz ist die Degradation der Proteine während der SDS-PAGE in der 2. Dimension durch den Inhibitor nicht vollständig zu unterdrücken. Speziell im niedrigen Massebereich der 1. Dimension (BN-PAGE) können im 2D-Gel immer noch weniger Proteine über 50 kDa detektiert werden als üblich (siehe Abbildung 5.70). Je höher die Masse des detektierbaren (Super-)Komplexes in der BN-PAGE, desto weniger Degradationseffekte treten in der SDS-PAGE der 2. Dimension auf. Trotzdem konnten auch hier einige Proteinspots gefunden werden, die durch ihre Lage offensichtlich einen Teil des (Super-)Komplexes darstellen, jedoch in den subsarcolemmalen Mitochondrien nicht als Untereinheit des entsprechenden Komplexes auftritt. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei diesen Spots

---

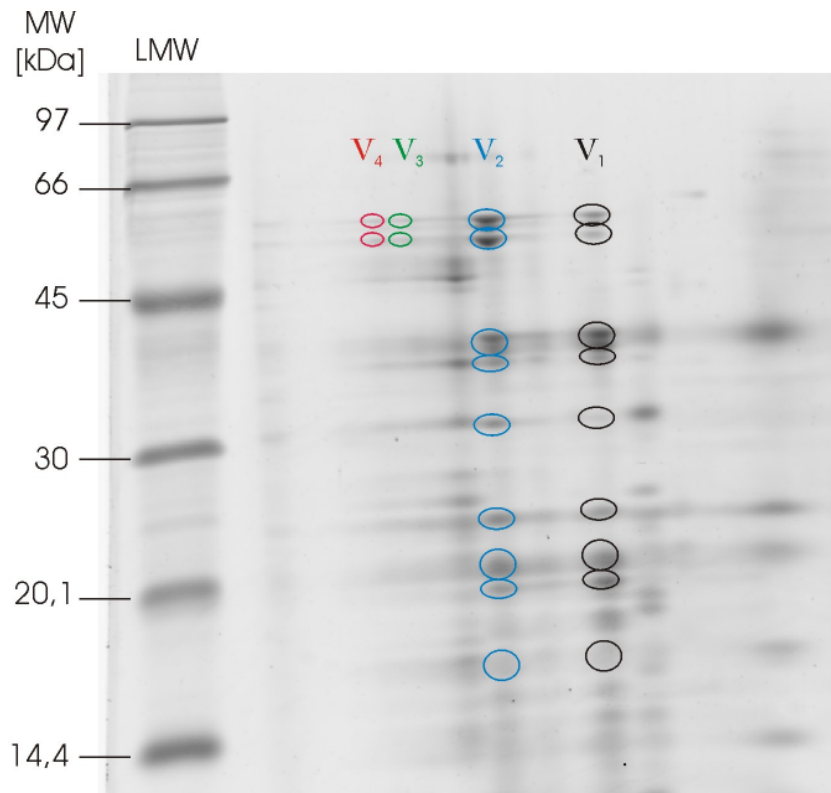
um Fragmente größerer Untereinheiten des untersuchten (Super-)Komplexes handelt, die durch die Proteaseaktivität während der SDS-PAGE in der 2. Dimension entstanden sind. Im Folgenden wurden die aus den subsarcolemmalen Mitochondrien bekannten Untereinheiten der jeweiligen Komplexe und Superkomplexe und die Spots der durch die aktive Protease entstandenen Proteinfragmente aufaddiert und verglichen. Abbildung 5.70 zeigt sowohl ein BN-Gel als auch ein 2D-Gel der untersuchten Proben. Es ist deutlich zu erkennen, dass die zugesetzte Protease in der ersten Dimension der BN-PAGE offensichtlich keine sichtbaren Veränderungen im Bandenmuster hervorruft, jedoch in der zweiten Dimension nach der SDS-PAGE deutliche Unterschiede zu einem herkömmlichen 2D-Gel aufweist (siehe dazu auch Kapitel 5.3).

Für die hier gezeigten Ergebnisse der quantifizierten Proteinkomplexe aus interfibrillären Rattenherzmitochondrien wurden aufgrund der relativ geringen isolierten Menge dieser Mitochondrienspezies die Proben der einzelnen Individuen innerhalb einer Gruppe zu gleichen Teilen vermischt und als Probenpool in 2D-BN/SDS-Gelen analysiert. Für jede der vier Gruppen wurden zwei technische Replikate angefertigt, sodass alle hier gezeigten Proteinmengen auf der Analyse von insgesamt acht Gelen beruhen.

Da es sich bei der hier durchgeführten Analyse um Probenpools handelt und jeweils zwei technische Replikate hergestellt wurden und damit die Probenmenge sehr klein ist, können keine statistischen Berechnungen durchgeführt werden, die Signifikanzen der detektierten Änderungen aufzeigen könnten. Die angegebenen Fehlerbalken in den nachfolgenden Diagrammen zeigen die Standardabweichungen der hergestellten Replikate und stellen allein den technischen Fehler dar, da durch das Poolen der Einzelindividuen vor der Analyse bereits künstlich ein Mittelwert aller Individuen einer Gruppe generiert wird und damit kein individueller Fehler detektierbar ist.

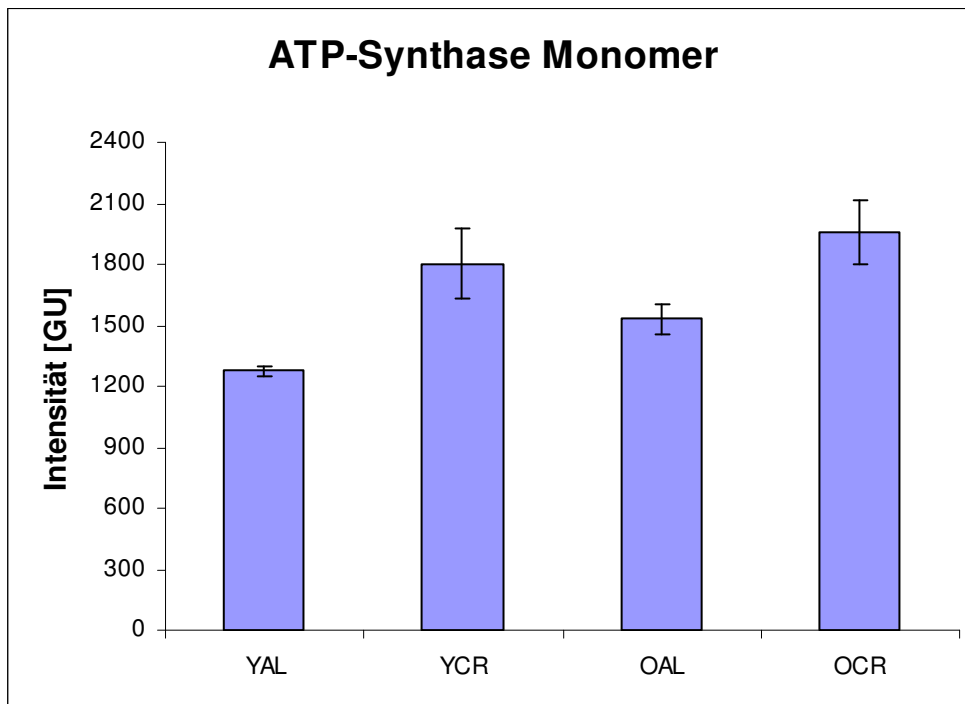
#### 5.5.2.1 ATP-Synthase

Von der  $F_0F_1$ -ATP-Synthase kann in den interfibrillären Mitochondrien aus Rattenherz neben dem Monomer auch in den oligomeren Formen Di-, Tri- und Tetramer gefunden werden. Die Lage der quantifizierten Spots, die zu den jeweiligen ATP-Synthase-Formen gefunden werden konnten, ist in Abbildung 5.71 abgebildet.



**Abb. 5.71:** Ausschnitt eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby gefärbten 2D-Gels (OCR-Gruppe) der untersuchten interfibrillären Mitochondrien aus Rattenherz. Die markierten Proteinspots zeigen Untereinheiten der ATP-Synthase und einige durch die während der Mitochondrienisolierung zugesetzten Protease hervorgerufene Fragmente von ATP-Synthase-Untereinheiten. In den untersuchten 2D-Gelen kann die ATP-Synthase neben dem Monomer (schwarz) auch in den oligomeren Formen Dimer (blau), Trimer (grün) und Tetramer (rot) in den hergestellten 2D-Gelen detektiert werden kann.

Für das Monomer der ATP-Synthase, dargestellt in Abbildung 5.72 können sowohl für die beiden Gruppen der *ad libitum* gefütterten Tiere als auch für die Gruppen der Tiere mit applizierter Kalorienrestriktion Erhöhungen der Menge mit zunehmendem Alter detektiert werden. Bei den Individuen, die freien Zugang zur Futterquelle hatten, beträgt die Zunahme 20%, während diese mit applizierter Kalorienrestriktion nur noch bei 9% liegt. Ebenfalls deutlich zu erkennen ist eine Erhöhung der Menge des ATP-Synthase-Monomers bei den Individuen mit Kalorienrestriktion gegenüber den normal gefütterten Individuen der gleichen Altersstufe. Diese Mengenzunahmen fallen mit Werten von 41% für die jungen Tiere und 28% für die alten Tiere deutlich höher aus als die, die auf Effekte des Alterns zurückzuführen sind.

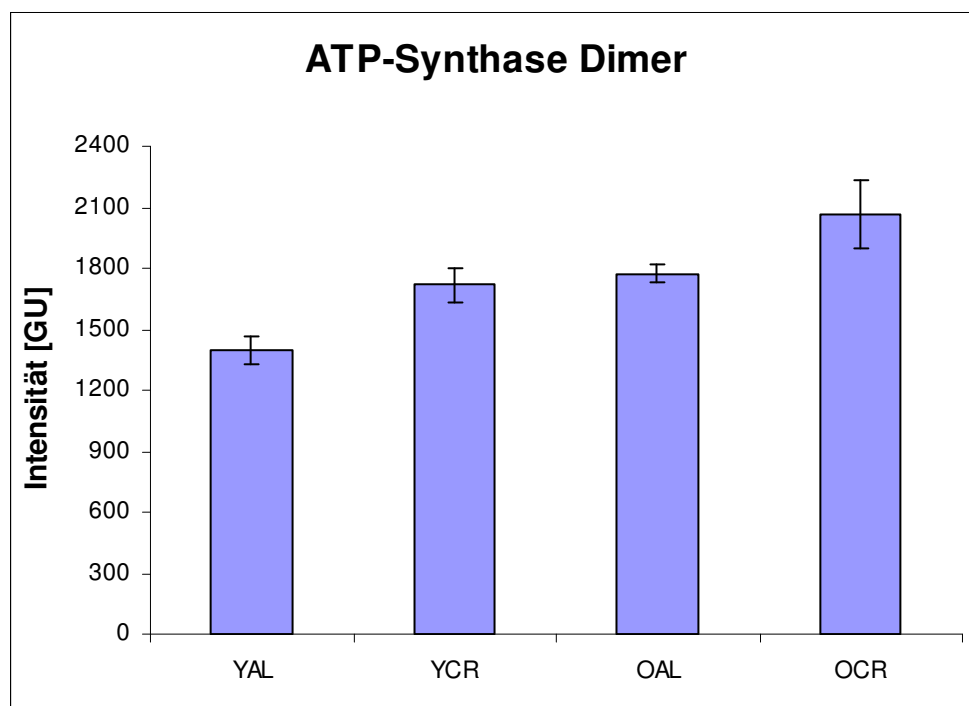


**Abb. 5.72:** Menge des Monomers der ATP-Synthase in gepoolten interfibrillären Rattenherzmitochondrien. Es zeigen sich altersbedingte Mengenzunahmen von 20% für die *ad libitum* gefütterten Tiere und 9% für die CR-Tiere. Ebenfalls sind Erhöhungen in Abhängigkeit von applizierter Kalorienrestriktion mit Werten von 41% für die jungen Tiere und 28% für die alten Tiere zu detektieren. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus  $n = 5$  für die jungen Tiere und  $n = 6$  für die alten Tiere.

Die Mengenveränderungen des Dimers der ATP-Synthase in Abbildung 5.73 zeigen ein ganz ähnliches Bild wie das des Monomers. Auch hier können deutliche altersbedingte Mengenzunahmen unabhängig von der Ernährungsform der Ratten beobachtet werden. Die beiden Gruppen der *ad libitum* gefütterten Tiere zeigen mit einer Erhöhung um 27% einen deutlicheren Mengenanstieg während des Alterns als die beiden Gruppen der Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, mit einer Mengenzunahme von 20%. Allerdings ist für beide Ernährungsformen ein deutlich höherer altersbedingter Anstieg der Menge des Dimers zu detektieren als für das Monomer. Auch für das Dimer lassen sich bei beiden Alterstufen CR-bedingte Mengenzunahmen detektieren, die für die jungen Individuen bei 23% und für die alten Individuen bei 16% liegen. Damit fallen die CR-bedingten Änderungen des ATP-Synthase-Dimers im Vergleich zum Monomer etwas weniger stark aus.

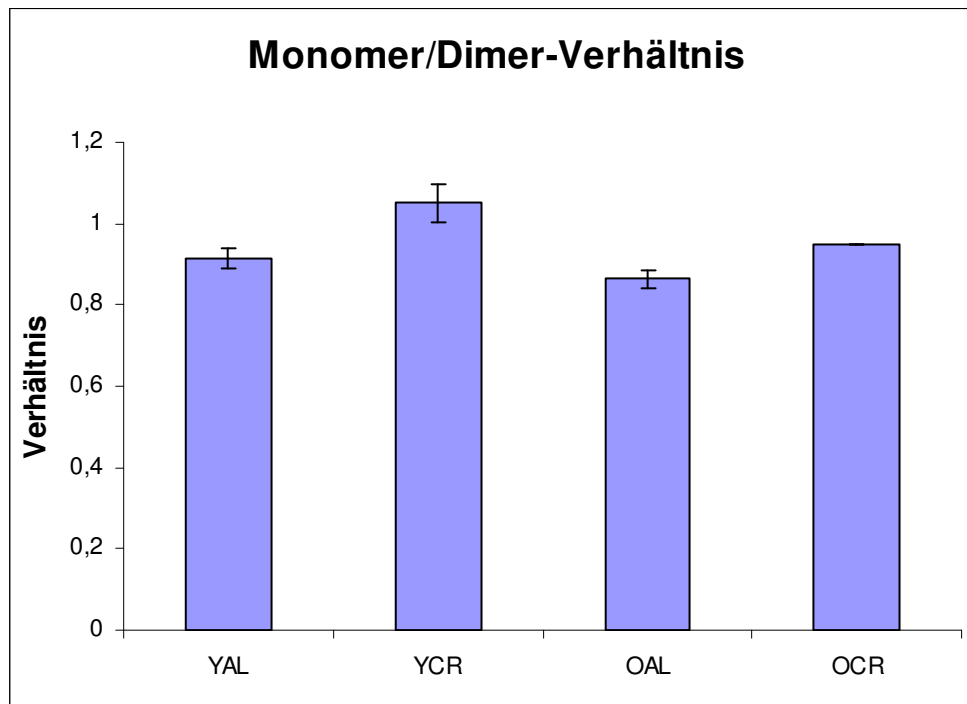
Die größere altersbedingte Mengenzunahme des Dimers der ATP-Synthase bei beiden untersuchten Ernährungsformen resultiert in einer leichten Verschiebung des Monomer/Dimer-Verhältnisses mit dem Alter, dargestellt in Abbildung 5.74. Für die *ad libitum* gefütterten Tiere bedeutet dies, dass das Verhältnis, das mit einem Wert von unter 1 bereits zur Seite des Dimers verschoben ist, nochmals eine leichte Abnahme von 0,91 auf 0,86 mit

dem Alter zeigt und damit die Tendenz zum Dimer noch verstärkt. Für die Tiere mit Kalorienrestriktion ergibt sich ebenfalls eine Abnahme des Wertes für das Monomer/Dimer-Verhältnis, allerdings kehrt sich hier die Tendenz der Verteilung auf Monomer und Dimer durch die Abnahme von 1,05 auf 0,95 um. Während demnach für die jungen CR-Tiere mehr Monomer detektiert werden konnte, kann für die alten CR-Tiere eine größere Menge an Dimeren beobachtet werden. In Abhängigkeit der Ernährung zeigt sich aufgrund der größeren CR-bedingten Mengenzunahmen des Dimers im Vergleich zum Monomer bei beiden Alterstufen eine Erhöhung des Wertes. Während für die *ad libitum* gefütterten jungen Tiere mit einem Monomer/Dimer-Verhältnis von 0,91 mehr Dimer als Monomer gefunden werden konnte, wird mit applizierter Kalorienrestriktion offenbar das Vorkommen des Monomers begünstigt, was der Wert von 1,05 widerspiegelt. Bei den alten Individuen kommt es ebenfalls zu einer Verschiebung des Verhältnisses zum Monomer hin, jedoch zeigen beide Gruppen der alten Tiere mit Werten unter 1 ein verstärktes Vorkommen des Dimers im Vergleich zum Monomer der ATP-Synthase.



**Abb. 5.73:** Menge des Dimers der ATP-Synthase in gepoolten interfibrillären Rattenherzmitochondrien. Es zeigen sich altersbedingte Mengenzunahmen von 27% für die *ad libitum* gefütterten Tiere und 20% für die CR-Tiere. Ebenfalls sind Erhöhungen in Abhängigkeit von applizierter Kalorienrestriktion mit Werten von 23% für die jungen Tiere und 16% für die alten Tiere zu detektieren.

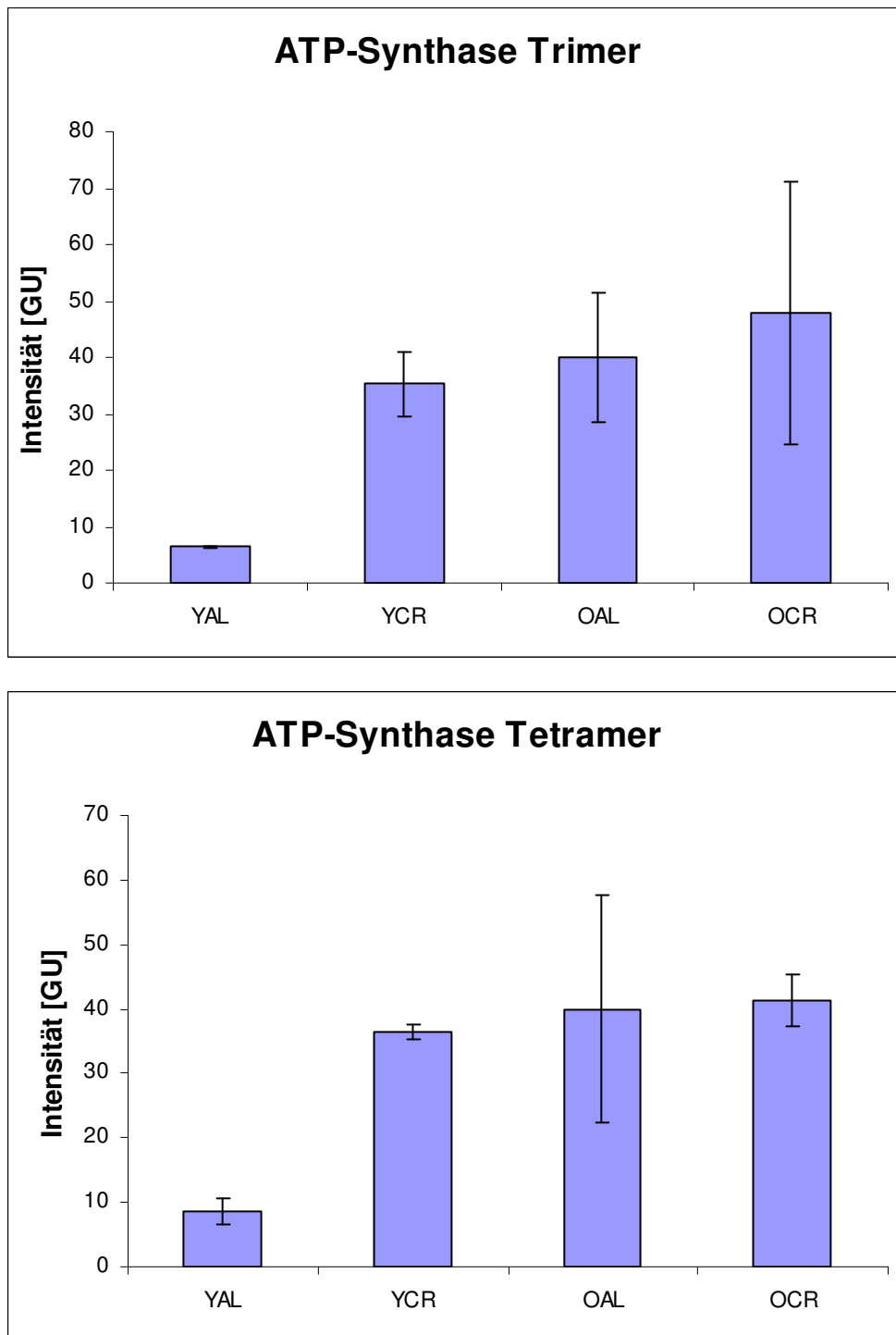
Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus  $n = 5$  für die jungen Tiere und  $n = 6$  für die alten Tiere.



**Abb. 5.74:** Monomer/Dimer-Verhältnis der ATP-Synthase in gepoolten interfibrillären Rattenherz-mitochondrien. Es zeigen sich altersbedingte Abnahmen des Wertes mit dem Altern für beide Ernährungsformen, sowie CR-bedingte Zunahmen des Monomer/Dimer-Verhältnisses bei beiden Altersstufen.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus  $n = 5$  für die jungen Tiere und  $n = 6$  für die alten Tiere.

Für das Trimer konnten nur die beiden größten Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  gefunden und quantifiziert werden. Die Summe der beiden Untereinheiten ist in Abbildung 5.75 (oben) dargestellt. Dabei zeigt sich eine äußerst geringe Menge des Trimers mit nur 6,5 GU bei der Gruppe der jungen *ad libitum* gefütterten Tiere im Vergleich zu den anderen drei untersuchten Gruppen, die Werte zwischen 35 und 48 GU aufweisen. Die hohen Standardabweichungen der Gruppen YCR, OAL und vor allem OCR zeigen hohe Schwankungen der detektierbaren Untereinheiten zwischen den hergestellten Replikaten, was allerdings bei Intensitäten unter 25 GU pro detektierter Untereinheit häufiger festgestellt werden kann. Jedoch sind dadurch die Änderungen, die die Mittelwerte der drei entsprechenden Gruppen untereinander zeigen, vermutlich nicht signifikant und damit auch keine realen Mengenänderungen zwischen diesen Gruppen. Einzig der sehr deutliche Unterschied zur YAL-Gruppe mit einer 5- bis 7-fachen Menge des ATP-Synthase-Trimers kann als tatsächliche Mengenänderung angenommen werden.



**Abb. 5.75:** Menge des Trimers (oben) und des Tetramers (unten) der ATP-Synthase in gepoolten interfibrillären Rattenherzmitochondrien. Es zeigt sich eine sehr ähnliche Mengenverteilung zwischen den Gruppen für beide Oligomere. Für die YAL-Gruppe kann kaum Trimer und Tetramer im Vergleich zu den anderen Gruppen detektiert werden. Die Änderungen zwischen den Gruppen YCR, OAL und OCR können allerdings aufgrund der teils sehr hohen Standardabweichungen nicht als tatsächliche Unterschiede angenommen werden.

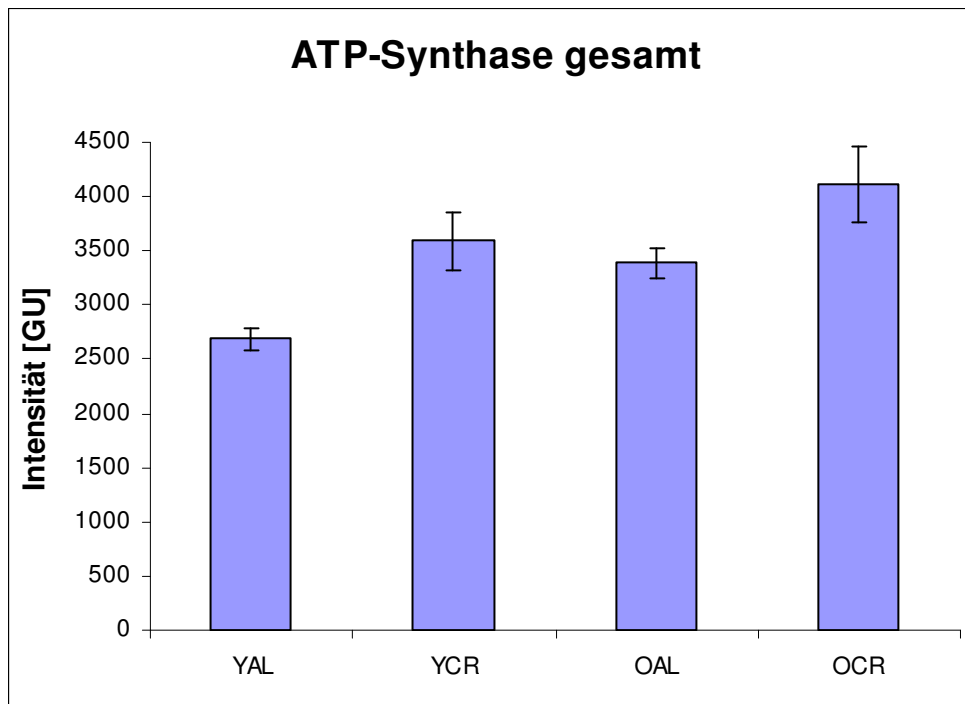
Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus  $n = 5$  für die jungen Tiere und  $n = 6$  für die alten Tiere.

---

Das Tetramer der ATP-Synthase aus interfibrillären Rattenherzmitochondrien zeigt ein sehr ähnliches Bild wie das des Trimers. Es können ebenfalls nur die beiden größten Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  für das Tetramer detektiert werden, die in Abbildung 5.75 (unten) als Summe dargestellt sind. Die YAL-Gruppe zeigt wie bereits beim Trimer der ATP-Synthase auch für das Tetramer mit 8,7 GU einen extrem kleinen Wert im Vergleich zu den anderen drei Gruppen, für die Intensitäten zwischen 36 und 41 GU detektiert werden konnten und damit kaum Mengenänderungen zeigen. Einzig die sehr deutlichen Änderungen der Gruppen YCR, OAL und OCR können aufgrund eines Anstiegs auf die 5-fache Menge des Tetramers im Vergleich zur Gruppe der jungen *ad libitum* gefütterten Tiere als echte Mengenänderung betrachtet werden.

Für die Gesamtmenge der ATP-Synthase, die in Abbildung 5.76 dargestellt ist, wurden alle Untereinheiten, die für das Monomer und die Oligomere gefunden wurden, aufaddiert. Die Gesamtsumme zeigt sowohl alternsbedingte Mengenzunahmen bei beiden Ernährungsformen, als auch Anstiege in der Menge aufgrund von applizierter Kalorienrestriktion bei beiden untersuchten Altersstufen. Der Mengenzuwachs aufgrund des Alterns beträgt bei den *ad libitum* gefütterten Tieren 26%, während er bei den Tieren mit applizierter Kalorienrestriktion mit 15% deutlich weniger stark ausfällt. Der durch eine Kalorienrestriktion verursachte Anstieg in der detektierten Intensität, die mit der Menge des untersuchten Komplexes gleichgesetzt werden kann, beträgt für die jungen Tiere sehr deutliche 34%, während für die alten Tiere ein Wert von 21% ermittelt werden konnte. Da die Standardabweichungen relativ gering sind, kann vermutlich davon ausgegangen werden, dass es sich hier um reale Änderungen handelt. Bei allen Gruppen tragen hauptsächlich das Monomer und das Dimer der ATP-Synthase zur Gesamtmenge bei, während die Summe der Tri- und Tetramere nur einen sehr geringen Bruchteil ausmachen. Dies trifft insbesondere auf die YAL-Gruppe zu, bei der diese nur mit einer Summe von ca. 15 GU (6,5 GU aus Trimer und 8,7 GU aus dem Tetramer) zur Gesamtmenge der ATP-Synthase mit einem Wert von insgesamt 2685 GU beitragen. Für die drei anderen Gruppen entfallen mit ca. 70 bis 90 GU für die Tri- und Tetramere ebenfalls nur ein äußerst geringer Teil der Gesamtmenge mit Werten zwischen 3385 GU und 4111 GU auf die beiden größten detektierbaren Oligomere der ATP-Synthase. Dieser verschwindend geringe Anteil ist einerseits nicht nur auf eine deutlich geringere Menge der Tri- und Tetramere zurückzuführen, sondern ist andererseits ebenfalls dem Umstand geschuldet, dass für Tri- und Tetramere nur die beiden größten Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  auf den 2D-Gelen zu detektieren sind, während für die Monomere und Dimere der ATP-Synthase ein Vielfaches an Proteinspots gefunden und ausgewertet werden konnten.



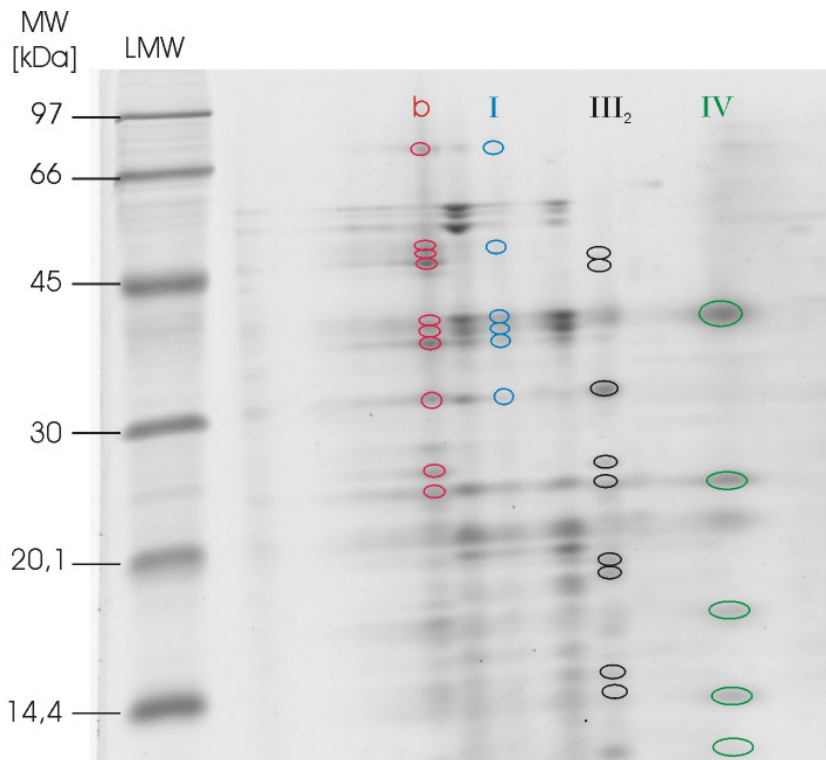


**Abb. 5.76:** Gesamtmenge aller detektierbaren Untereinheiten in den verschiedenen Oligomeren der ATP-Synthase in gepoolten interfibrillären Rattenherzmitochondrien. Es zeigt sich eine altersbedingte Mengenzunahme um 26% bei den *ad libitum* gefütterten Individuen und um 15% bei den beiden Gruppen der Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden. Es kann ebenfalls mit applizierter Kalorienrestriktion eine Mengenzunahme von 34% bei den jungen Tieren werden, während für die alten Individuen eine Zunahme von 21% infolge der Kalorienrestriktion beobachtet werden kann.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus  $n = 5$  für die jungen Tiere und  $n = 6$  für die alten Tiere.

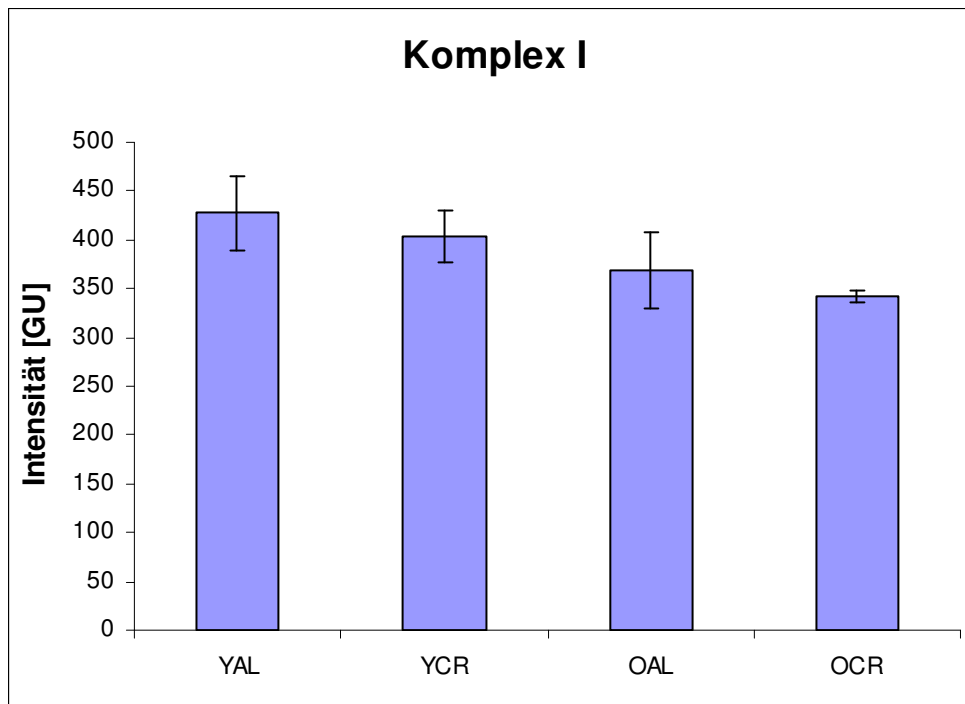
#### 5.5.2.2 Individuelle Komplexe und Superkomplex b

Auf den 2D-Gelen der interfibrillären Mitochondrien können diverse Untereinheiten sowohl von den individuellen Komplexen I, III<sub>2</sub> und IV, als auch des Superkomplexes b identifiziert und quantifiziert werden. Die zum selben (Super-)Komplex gehörenden Untereinheiten wurden für die Darstellung in den nachfolgenden Diagrammen aufsummiert. Bei der Zuordnung der Proteinspots zu den jeweiligen Komplexen und Superkomplexen wurden sowohl die in der Arbeitsgruppe bestehenden MALDI-Daten als auch der Vergleich mit den 2D-Gelen der subsarcolemmalen Mitochondrien herangezogen. Abbildung 5.77 zeigt die Lage der quantifizierten Proteinspots und deren Zugehörigkeit zu den verschiedenen Komplexen.



**Abb. 5.77:** Ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby gefärbtes 2D-Gel (OCR-Gruppe) der untersuchten interfibrillären Mitochondrien aus Rattenherz. Die markierten Proteinspots zeigen Untereinheiten der detektierten und quantifizierten individuellen Komplexe IV (grün), III<sub>2</sub> (schwarz) und I (blau), sowie des Superkomplexes b (rot).

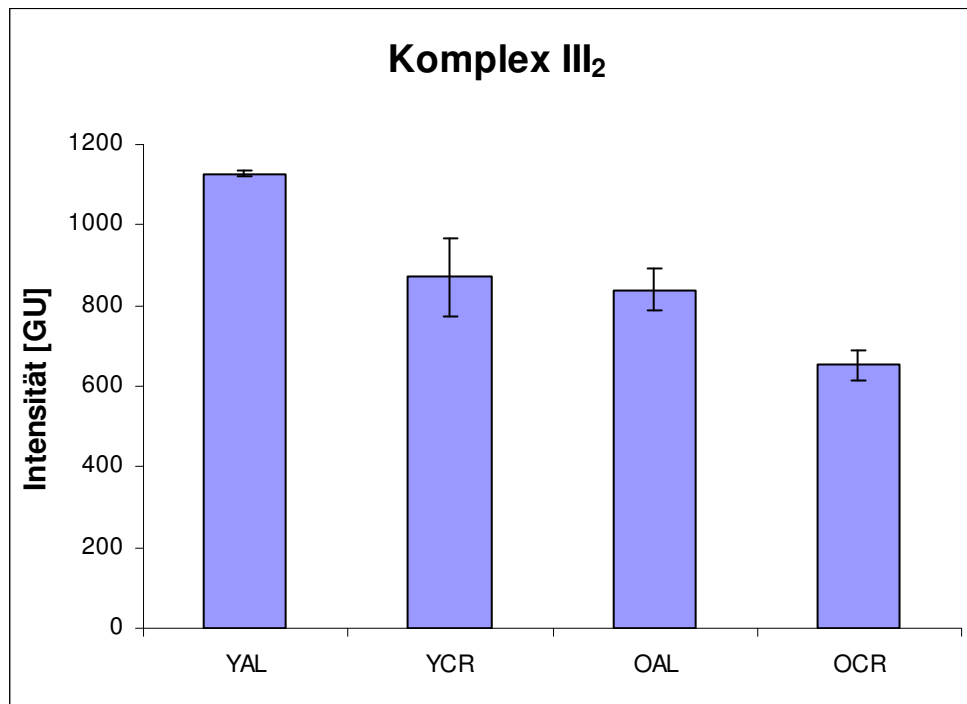
Die Menge von Komplex I, dargestellt in Abbildung 5.78, reduziert sich sowohl mit applizierter Kalorienrestriktion in beiden Altersstufen als auch mit dem Alter bei beiden Ernährungsformen. Die CR-bedingten Mengenabnahmen liegen bei 6% für die jungen Tiere und bei 7% für die alten Tiere. Die Standardabweichungen von drei der vier untersuchten Gruppen sind zwar nicht sehr hoch, allerdings befinden sie sich mit ca. 6% bis maximal ca. 10% in ähnlichen Bereichen wie die detektierten Änderungen, die aufgrund der applizierten Kalorienrestriktion auftreten. Dies deutet darauf hin, dass die hier beobachteten Mengenabnahmen nicht als tatsächliche CR-bedingte Änderungen in der Komplex I-Menge angenommen werden können. Die Abnahmen in der Menge von Komplex I, die durch das Altern verursacht werden, liegen mit 14% für die *ad libitum* gefütterten Tiere und 15% für die Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, deutlich höher als die der CR-bedingten Mengenabnahmen und damit ebenfalls höher als die Standardabweichung der einzelnen Gruppen. Dies könnte darauf hindeuten, dass es sich bei den hier detektierten Abnahmen um tatsächliche Änderungen in der Menge von Komplex I im Zuge des Alterns handelt.



**Abb. 5.78:** Menge von Komplex I in gepoolten interfibrillären Rattenherzmitochondrien. Es zeigt sich eine Abnahme der Menge sowohl mit dem Alter als auch mit applizierter Kalorienrestriktion. Aufgrund der teils sehr geringen Abnahmen aufgrund der Kalorienrestriktion bei beiden Alterstufen von nur 6 bzw. 7% und der gleichzeitig auftretenden Standardabweichung in etwa der gleichen Höhe können diese vermutlich nicht als echte Änderungen in der Komplex I-Menge angenommen werden. Im Gegensatz dazu könnten die altersbedingten Abnahmen von 14% für die *ad libitum* gefütterten Tiere und 15% für die CR-Tiere auf eine tatsächliche Mengenänderung mit dem Alter hindeuten.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus  $n = 5$  für die jungen Tiere und  $n = 6$  für die alten Tiere.

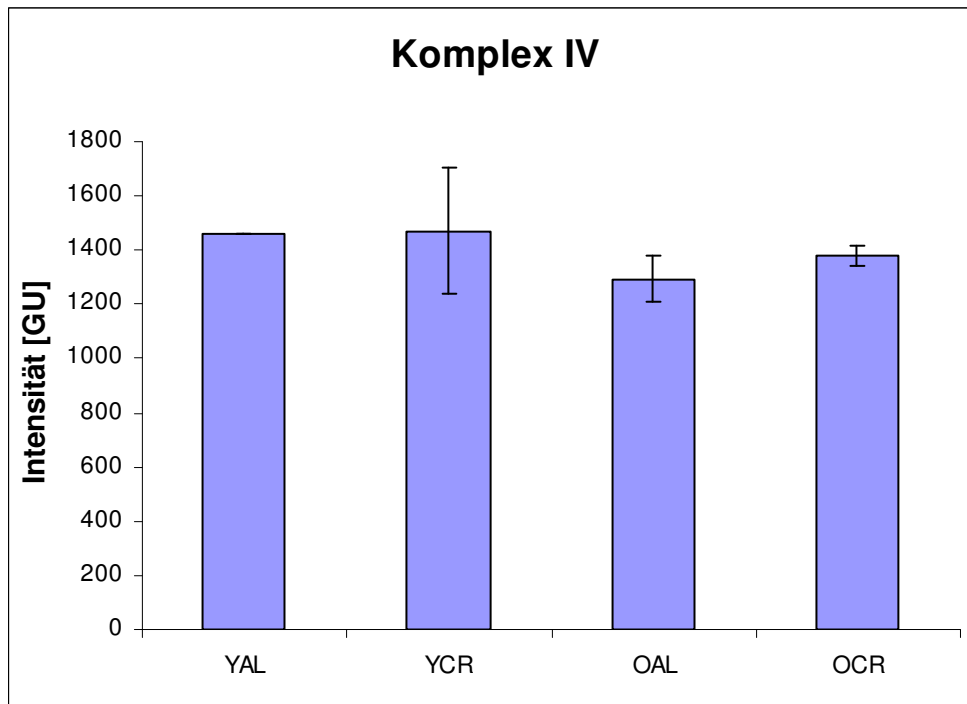
Die Summen der detektierten Untereinheiten für Komplex III<sub>2</sub>, dargestellt in Abbildung 5.79, zeigen sehr deutliche Mengenabnahmen sowohl in Abhängigkeit vom Altern als auch aufgrund der applizierten Kalorienrestriktion. Für beide Ernährungsformen der untersuchten Tiere ergibt sich ein Rückgang der Menge an Komplex III<sub>2</sub> um 25% mit fortgeschrittenem Alter. Ebenso wie das Altern verursacht eine Kalorienrestriktion ebenfalls eine Mengenabnahme, die für die jungen Tiere 23% beträgt und bei den alten Tieren bei 22% liegt. Da sowohl das Altern als auch die Kalorienrestriktion eine Erniedrigung der detektierbaren Intensitäten für Untereinheiten von Komplex III<sub>2</sub> bewirken, kann für die Gruppe der jungen *ad libitum* gefütterten Tiere mit Abstand die höchste Intensität mit 1126 GU detektiert werden. Im Gegensatz dazu weist die Gruppe der alten Individuen, die zusätzlich noch einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, mit 653 GU nur noch etwas mehr als die Hälfte der Menge von Komplex III<sub>2</sub> im Vergleich zur YAL-Gruppe auf.



**Abb. 5.79:** Menge von Komplex III<sub>2</sub> in gepoolten interfibrillären Rattenherzmitochondrien. Es zeigt sich eine altersbedingte Abnahme der Menge bei beiden Ernährungsformen, die sowohl bei den *ad libitum* gefütterten Tieren als auch bei den CR-Tieren 25% beträgt. Ebenso kann eine CR-bedingte Abnahme für beide Altersstufen detektiert werden. Dabei reduziert sich die Menge von Komplex I bei den jungen Tieren um 23% und bei den alten Tieren um 22%. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus n = 5 für die jungen Tiere und n = 6 für die alten Tiere.

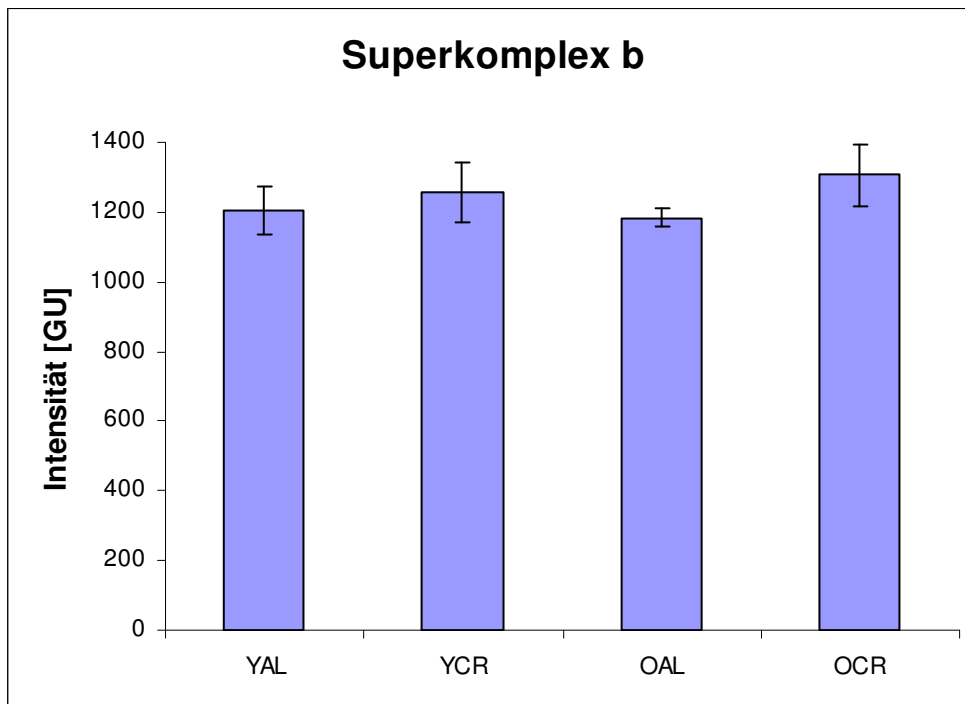
Bei Komplex IV der Atmungskette konnte in den interfibrillären Mitochondrien aus Rattenherz nur das Monomer des Komplexes eindeutig zugeordnet werden. Die gefundenen Untereinheiten wurden aufsummiert und in Abbildung 5.80 dargestellt. Dabei zeigen sich nur sehr wenige Änderungen in der detektierbaren Menge von Komplex IV. Während sich bei den jungen Tieren keine Mengenänderungen aufgrund der applizierten Kalorienrestriktion zeigen, kann für die alten Tiere eine minimale Zunahme von 7% detektiert werden. Für beide Ernährungsformen werden minimale Rückgänge in der Spotintensität, die mit der Menge an Komplex IV gleichgesetzt werden kann, beobachtet. Mit einer altersbedingten Abnahme von nur 12% für die *ad libitum* gefütterten Tiere handelt es sich dabei bereits um die größte detektierbare Mengenänderung innerhalb der vier untersuchten Gruppen. Betrachtet man sich hingegen die beiden Gruppen, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, so kann zwar ebenfalls eine Mengenabnahme von Komplex IV beobachtet werden, jedoch fällt diese mit 6% sehr klein aus. Bezieht man die Standardabweichungen in die Vergleiche mit ein, so ist zu erkennen, dass diese mit 0,04% für die YAL-Gruppe von extrem klein bis hin zu recht hoch mit 15,7% für die YCR-Gruppe ausfallen. Für die beiden Gruppen der alten Tiere liegen diese bei 6,5% und 2,6%. Da sich alle detektierten Werte für Änderungen in der Komplex IV-

Menge mehr oder minder innerhalb dieser Standardabweichungen bewegen, ist anzunehmen, dass die Menge des Komplexes unabhängig von Altern und Kalorienrestriktion nahezu konstant bleibt. Einzig die größte detektierbare Änderung mit einer Abnahme von 12% für die *ad libitum* gefütterten Tiere könnte aufgrund der teils sehr geringen Standardabweichungen insbesondere der YAL-Gruppe eventuell darauf hindeuten, dass tatsächlich eine Tendenz zu einer leichten Reduktion der Komplex IV-Menge bestehen kann.



**Abb. 5.80:** Menge von Komplex IV in gepoolten interfibrillären Rattenherzmitochondrien. Es zeigen sich nur minimale Änderungen in der Menge. Für die jungen Tiere kann keine CR-bedingte Änderung festgestellt werden, während für die alten Tiere eine minimale Zunahme von 7% detektiert werden kann. Mit dem Alter kann für die *ad libitum* gefütterten Tiere eine Abnahme von 12% und für die CR-Tiere eine Reduktion um 6% detektiert werden. Die nur minimalen Unterschiede deuten darauf hin, dass die Menge an Komplex IV unabhängig von Ernährung und Alter nahezu konstant bleibt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus  $n = 5$  für die jungen Tiere und  $n = 6$  für die alten Tiere.

Bei der detektierten Menge an Superkomplex b in Abbildung 5.81 zeigt sich ein recht ähnliches Bild wie bei Komplex IV. Es sind zwischen den untersuchten Gruppen nur minimale Änderungen zu beobachten. Die maximale Veränderung beim Vergleich der Gruppen untereinander ist für die alten Tiere zu detektieren, die mit einer CR-bedingten Zunahme von 10% kaum den Wertebereich überschreitet, in dem sich die Standardabweichungen der Proben mit bis zu 7% bewegen. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass die Menge an Superkomplex b in interfibrillären Mitochondrien weder durch das Altern noch aufgrund einer applizierten Kalorienrestriktion beeinflusst wird.



**Abb. 5.81:** Menge von Superkomplex b in gepoolten interfibrillären Rattenherzmitochondrien. Es zeigen sich nur minimale Änderungen in der Menge. Mit detektierbaren Mengenänderungen von maximal 10% liegen diese größtenteils in einem ähnlichen Bereich wie die Standardabweichungen und können daher vermutlich nicht als reale Änderungen der Menge an Superkomplex b angenommen werden.

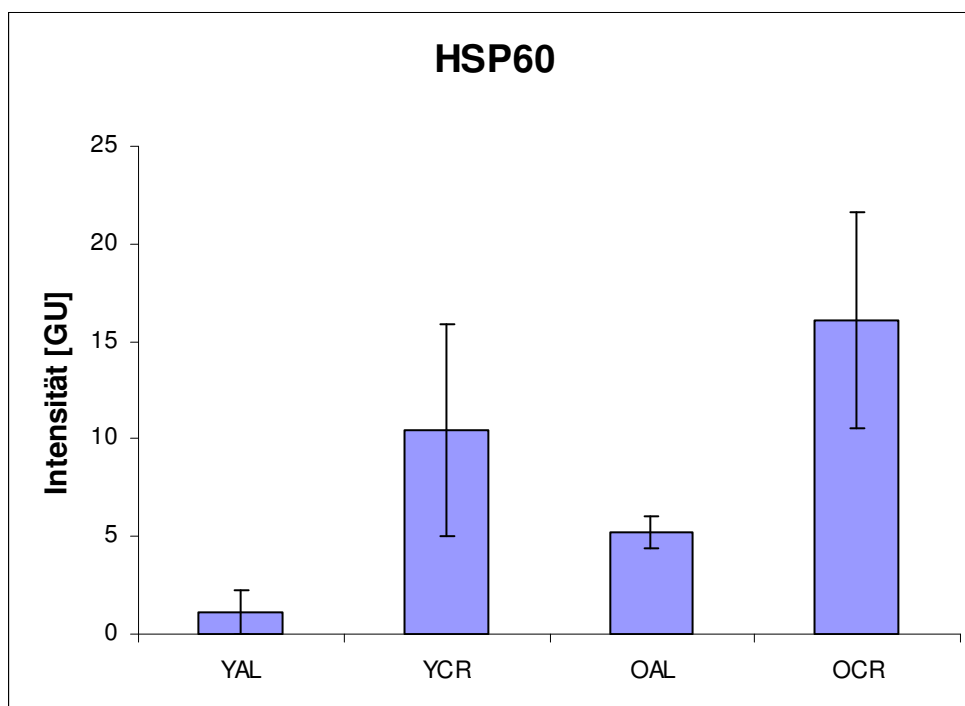
Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus  $n = 5$  für die jungen Tiere und  $n = 6$  für die alten Tiere.

### 5.5.2.3 Nicht-OxPhos-Proteine

Für die mitochondrialen Proteine, die nicht Teil der Atmungskette sind, konnte nur das Chaperon HSP60 quantifiziert werden. Da dieses als Heptamer in den Mitochondrien vorliegt, ist es in der ersten Dimension mit einer Masse von ca. 420 kDa in einem Bereich, der für Proteinkomplexe, die nicht der Atmungskette angehören, schon sehr hoch ist. Der Großteil der anderen mitochondrialen Proteine, die ebenfalls nicht an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind, können in einem deutlich niedrigeren Molekularmassen-Bereich gefunden werden. Da allerdings Proteine und Proteinkomplexe mit sinkender Masse in der ersten Dimension größeren Degradationseffekten durch die Protease in der zweiten Dimension unterworfen sind, können diese leider nicht gefunden und damit quantifiziert werden.

Die quantifizierten Mengen von HSP60 in den interfibrillären Rattenherzmitochondrien sind in Abbildung 5.82 dargestellt. Es zeigen sich nicht nur sehr starke Mengenänderung zwischen den untersuchten Gruppen, sondern auch sehr hohe Standardabweichungen, die allerdings

zum Teil auf die extrem geringen Intensitäten von maximal 16 GU zurückzuführen sind. Für die YAL-Gruppe, die mit Abstand die geringste Menge an HSP60 aufweist, liegt die detektierte Intensität sogar nur bei 1,1 GU, während hier die Standardabweichung fast den selben Wert annimmt. Trotz der niedrigen Werte und der teils äußerst hohen Standardabweichungen ist recht deutlich zu erkennen, dass sich sowohl mit dem Alter als auch mit applizierter Kalorienrestriktion Mengenzunahmen detektieren lassen. Während die Menge von HSP60 aufgrund des Alterns bei den *ad libitum* gefütterten Ratten auf den ca. 5-fachen Wert ansteigt, kommt es bei den CR-Tieren nur zu einem Anstieg um 54%, wobei diese Mengenänderung aufgrund der extrem hohen Standardabweichungen gerade bei den CR-Tieren vermutlich nicht den realen Bedingungen entspricht. Bezüglich der Effekte der applizierten Kalorienrestriktion zeigt sich eine sehr starke Erhöhung der HSP60-Menge in beiden Altersstufen bei gleichzeitiger Reduktion des Futters. Bei den jungen Tieren erhöht sich die Intensität auf ca. den 10-fachen Wert, während sich die Intensität bei den alten Individuen etwa verdreifacht mit applizierter Kalorienrestriktion.

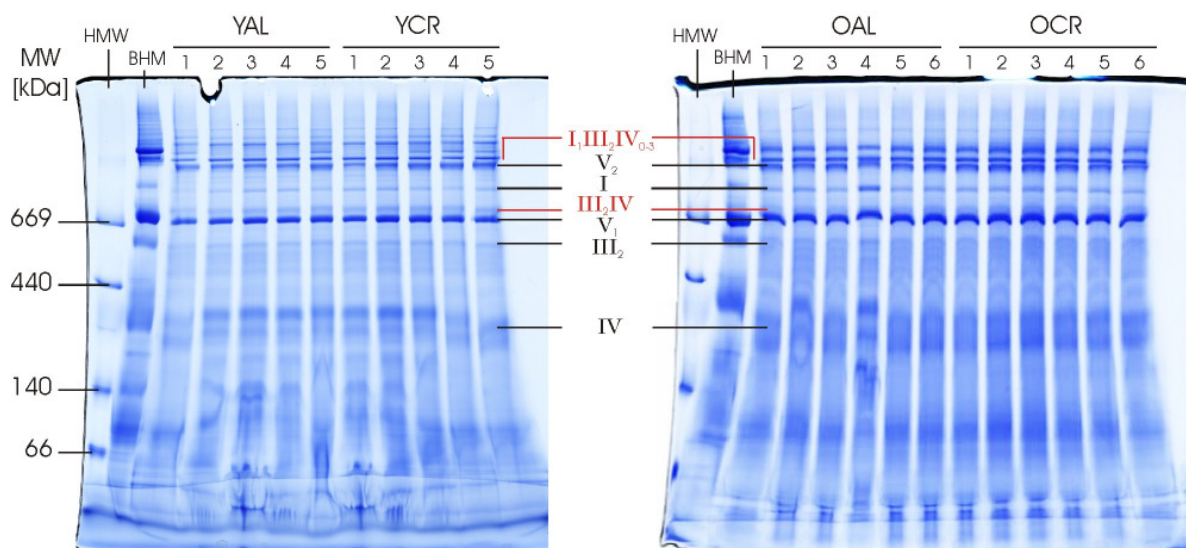


**Abb. 5.82:** Menge von HSP60 in gepoolten interfibrillären Rattenherzmitochondrien. Es zeigen sich enorme Mengenzunahmen sowohl mit dem Altern als auch mit Kalorienrestriktion. Durch Letzteres können eine ca. 10-fache und eine 3-fache Erhöhung der Menge bei den CR-Tieren im Vergleich mit den Individuen des gleichen Alters mit freiem Zugang zum Futter detektiert werden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus  $n = 5$  für die jungen Tiere und  $n = 6$  für die alten Tiere.

### 5.5.3 Hirn

Die in dieser Arbeit verwendeten Rattenhirnproben stammen aus den gleichen Tieren wie die zuvor besprochenen Rattenherzproben. Bei den hier untersuchten Rattenhirnen handelt es sich um Cerebrumgewebe, das auch als Großhirn bezeichnet wird, und besteht aus dem Cortex, den Basalganglien und dem limbischen System. Die Isolierung der Mitochondrien wurde von Dr. D. Dani in der Arbeitsgruppe Dencher durchgeführt, während die Herstellung der den Ergebnissen zugrunde liegenden 2D-Gele und die Analyse des mitochondrialen Proteoms durch Dipl.-Biol. Michaela Söhn im Rahmen ihrer Diplomarbeit<sup>[91]</sup> unter meiner Anleitung erfolgte. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen ausschließlich die Summen aller detektierten Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe und -superkomplexe. Eine ausführlichere Beschreibung der Ergebnisse und die Verteilung der Gesamtmenge auf die einzelnen Untereinheiten können in der Diplomarbeit von Michaela Söhn<sup>[91]</sup> nachgeschlagen werden.

Für die hier gezeigte Analyse des mitochondrialen Proteoms wurden von jeder Hirnprobe, die jeweils einem Individuum entspricht, jeweils zwei 2D-BN/SDS-Gele hergestellt. Für die Gruppen der jungen Tiere standen jeweils 5 Individuen zur Verfügung, für die Gruppen der alten Tiere betrug die Probenmenge jeweils 6 Individuen, die einzeln in Abbildung 5.83 in BN-Gelen dargestellt sind. Die Daten der quantitativen Proteomanalyse basieren demnach auf einer Anzahl von 44 2D-BN/SDS-Gelen.



**Abb. 5.83:** BN-Gele der Mitochondrien aus Cerebrum aller 22 untersuchten Proben. Die Mitochondrien wurden mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 8g/g solubilisiert. Pro Spur wurden 80 µg Protein vor Solubilisierung aufgetragen, für BHM 70 µg. Individuelle Komplexe sind in schwarz dargestellt, Superkomplexe in rot.

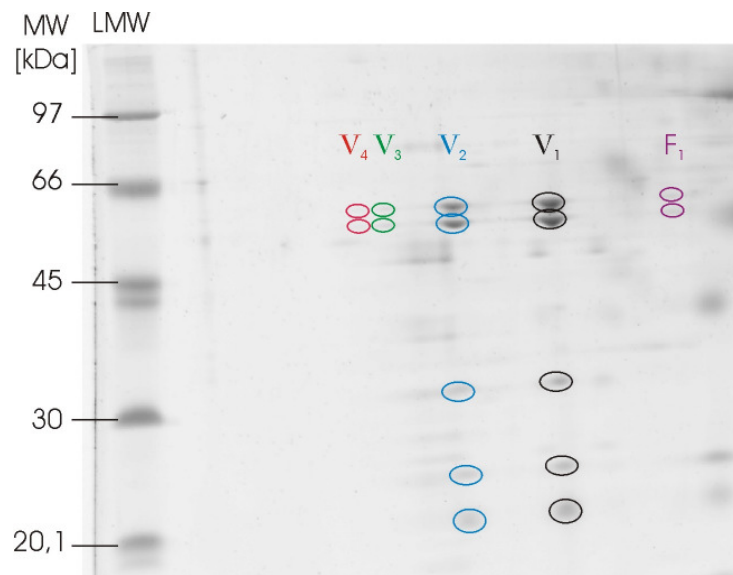


Die untersuchten Proteinspots auf den 2D-Gelen wurden aufgrund von verschiedenen MALDI-Analysen mittels PMF (peptide mass fingerprinting) in der Arbeitsgruppe Dencher identifiziert und konnten so den dazugehörigen Proteinkomplexen zugeordnet werden. Der Großteil dieser Proteine und Proteinuntereinheiten wurde von Reifschneider<sup>[93, 110]</sup> identifiziert, eine weitere PMF-Analyse durch Michaela Söhn<sup>[91]</sup> diente zur Verifizierung einiger Proteinspots. Zudem dienten das in der Arbeitsgruppe sehr gut charakterisierte Rinderherz und *In-Gel*-Aktivitätstests der untersuchten Proben als Hilfe bei der Zuordnung von Komplexen und deren Superkomplexen.

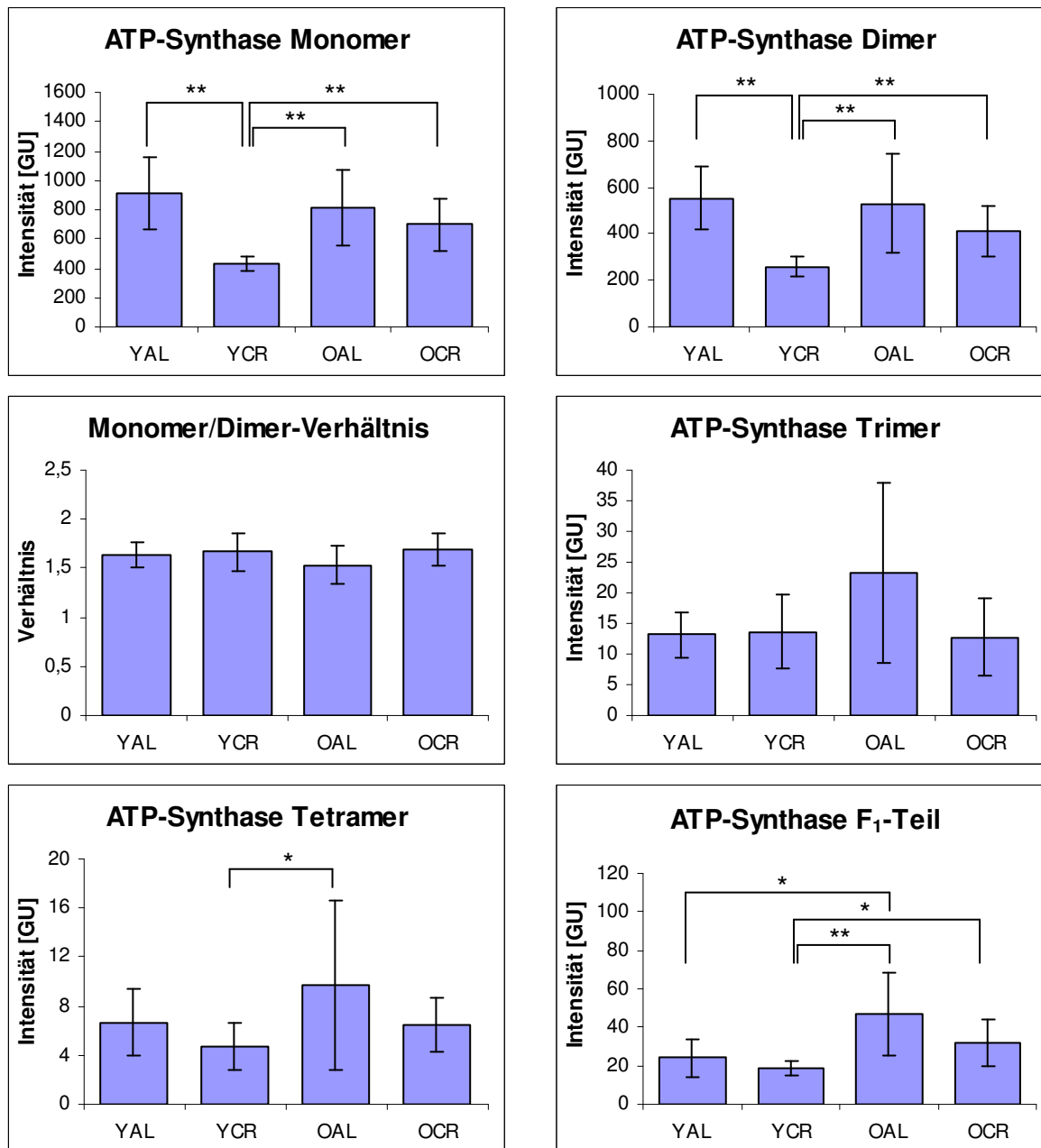
Die Probenmenge von 5 bzw. 6 Individuen pro Gruppe lässt eine statistische Analyse der Daten zu, deren Resultate jeweils in die nachfolgenden Diagramme integriert sind. Als statistische Methode wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Rangsummentest gewählt.

### 5.5.3.1 ATP-Synthase

Die ATP-Synthase kann in den hergestellten 2D-Gelen als Monomer sowie in den oligomeren Formen Dimer, Trimer und Tetramer gefunden werden. Desweiteren können die beiden größten Untereinheiten der ATP-Synthase,  $\alpha$  und  $\beta$ , ebenfalls für den freien Kopfteil der ATP-Synthase, auch als freier  $F_1$ -Teil bezeichnet, in den Gelen detektiert werden. Die Lage aller untersuchten Untereinheiten der ATP-Synthase ist in Abbildung 5.84 dargestellt.



**Abb. 5.84:** Ausschnitt eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO<sup>®</sup> Ruby gefärbten 2D-Gels der untersuchten Mitochondrien. Die markierten Proteinspots zeigen die quantifizierten Untereinheiten der ATP-Synthase, die neben dem Monomer (schwarz) auch in den oligomeren Formen Dimer (blau), Trimer (grün) und Tetramer (rot) in den hergestellten 2D-Gelen detektiert werden kann. Darüber hinaus kann ebenfalls der freie  $F_1$ -Teil der ATP-Synthase (lila) gefunden werden.



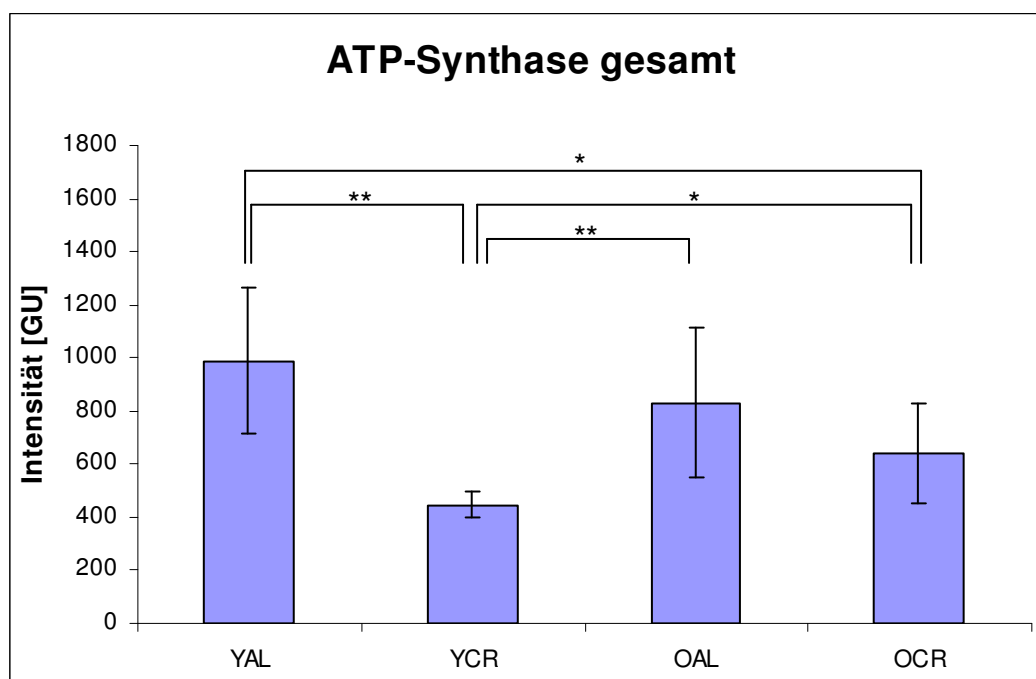
**Abb. 5.85:** Detektierte Mengen der ATP-Synthase aus Hirnmitochondrien in deren Formen Monomer und Dimer, das Verhältnis der Mengen von Monomer zu Dimer, der Oligomere Trimer und Tetramer und des freien F<sub>1</sub>-Teils der ATP-Synthase. Es ist deutlich zu erkennen, dass Monomer und Dimer die gleichen Mengenänderungen zeigen, die deutlichste davon ist eine signifikante Mengenabnahme der YCR-Gruppe im Vergleich mit den anderen drei Gruppen. Das Monomer/Dimer-Verhältnis zeigt nur minimale Änderungen und mit Werten zwischen 1,5 und 1,7 für alle Gruppen einen deutlichen Überschuss an Monomer. Bei dem Trimer kann für die Gruppen YAL, YCR und OCR keine Änderung der Menge detektiert werden, nur für die OAL-Gruppe ist eine deutliche, allerdings nicht signifikante, Mengenzunahme zu verzeichnen. Das Tetramer zeigt sowohl altersabhängige Mengenzunahmen als auch CR-bedingte Mengenabnahmen, allerdings sind diese nicht signifikant. Für den F<sub>1</sub>-Teil der ATP-Synthase kann eine signifikante Zunahme mit dem Alter für beide Ernährungsformen detektiert werden. Die Menge an F<sub>1</sub>-Teil ist für alle Gruppen höher als die des Trimers und Tetramers zusammen.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei n = 5 für die jungen und n = 6 für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 )

---

Die aufsummierten Untereinheiten der in den 2D-Gelen detektierten und quantifizierten ATP-Synthase-Formen sind in Abbildung 5.85 dargestellt. Es zeigt sich für das Monomer und das Dimer der ATP-Synthase eine gleiche Verteilung der Menge zwischen den vier untersuchten Gruppen. Sowohl für das Monomer als auch für das Dimer können für die Gruppe der jungen Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, deutlich reduzierte Mengen gegenüber den anderen drei Gruppen detektiert werden. Diese Mengenabnahme beträgt bei beiden Formen der ATP-Synthase signifikante 53% im Vergleich mit der Gruppe der jungen *ad libitum* gefütterten Tiere. Auch bei den beiden Gruppen der alten Tiere ist die detektierte Mengenminderung der YCR-Gruppe unabhängig von der Ernährung mit *p*-Werten von unter 0,01 signifikant. Für beide Formen der ATP-Synthase sind auch für die alten Tiere Abnahmen der Menge mit gleichzeitiger applizierter Kalorienrestriktion zu beobachten. Diese liegen aber mit 14% für das Monomer und 22% für das Dimer im Bereich der Standardabweichungen der beiden Gruppen und sind damit nicht signifikant. Die detektierten Intensitäten sind, wenn sie in der Einheit GU angegeben sind, direkt miteinander vergleichbar und zeigen, dass das Dimer der ATP-Synthase mit unter 600 GU für die YAL-Gruppe in deutlich geringerer Menge vorliegt als das Monomer mit knapp über 900 GU. Dies spiegelt sich im Monomer/Dimer-Verhältnis der Proben wieder, das für alle Gruppen einen Wert zwischen 1,5 und 1,7 zeigt. Da sich für das Verhältnis nur minimale Änderungen zwischen den Gruppen beobachten lassen, ergeben sich keine signifikanten Veränderungen. Das Trimer der ATP-Synthase zeigt für die Gruppen YAL, YCR und OCR keine Mengenänderung, einzig die alten *ad libitum* gefütterten Tiere zeigen eine deutliche Zunahme der Trimer-Menge von ca. 80% im Vergleich mit den anderen drei untersuchten Gruppen. Aufgrund der sehr hohen Standardabweichung der OAL-Gruppe ist diese deutliche Erhöhung allerdings nicht signifikant. Das Tetramer zeigt sowohl kleine altersbedingte Mengenzunahmen für beide Ernährungsformen als auch CR-bedingte Mengenabnahmen für beide Altersstufen, allerdings ist keine dieser detektierten Änderungen signifikant. Einzig der Vergleich der YCR- und der OAL-Gruppe zeigt mit einem *p*-Wert von unter 0,05 eine Signifikanz. Bei allen Gruppen, insbesondere bei der OAL-Gruppe ergeben sich sehr hohe Standardabweichungen, die zum Teil durch die sehr niedrigen gemessenen Intensitäten von maximal 10 GU bedingt sind. Der freie F<sub>1</sub>-Teil der ATP-Synthase zeigt altersbedingte Anstiege der Menge bei beiden Ernährungsformen, die mit *p*-Werten von unter 0,05 signifikant sind. Diese liegen bei 95% für die *ad libitum* gefütterten Tiere und bei 67% für die beiden Gruppen der Tiere mit applizierter Kalorienrestriktion. Zusätzlich zur altersbedingten Mengenzunahme kann eine CR-bedingte Abnahme für beide Altersstufen beobachtet werden. Diese beträgt für die jungen Tiere 21% und für die alten Tiere 32%, allerdings sind beide Veränderungen nicht signifikant. Bei allen Gruppen zeigen sich mit Intensitäten zwischen 19 GU und 47 GU größere Mengen für den freien F<sub>1</sub>-Teil als für das

Trimer und das Tetramer zusammen. Noch nicht geklärt ist die Frage, ob es sich bei dem freien  $F_1$ -Teil um noch nicht assemblierte ATP-Synthase oder um ein Abbauprodukt intakter ATP-Synthase-Komplexe handelt und ob diese vorsätzlich abgebaut wurden bzw. diese durch Instabilität aufgrund äußerer Einflüsse denaturiert. Bisher konnte für jedes Gewebe und in verschiedenen Organismen geringe Anteile des freien  $F_1$ -Teils gefunden werden<sup>[91-93, 103, 105]</sup>, nichtsdestotrotz ist das Vorhandensein von freiem  $F_1$ -Teil in größeren Mengen ein Nachteil für die Zellen, da dieser auch in dissoziiertem Zustand als katalytisch aktiver Teil der ATP-Synthase<sup>[168]</sup> in der Lage ist, ATP zu hydrolysieren und damit den Energiehaushalt der Zelle stark zu beeinflussen.



**Abb. 5.86:** Gesamtmenge der ATP-Synthase aus Hirnmitochondrien, beruhend auf den Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  des Monomers sowie der Oligomere Dimer, Trimer und Tetramer. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei beiden Altersstufen aus der Kalorienrestriktion eine Mengenabnahme der ATP-Synthase resultiert, die bei den jungen Tieren signifikante 54% und bei den alten Tieren nicht-signifikante 23% beträgt. Für die *ad libitum* gefütterten Tiere ist eine altersbedingte Abnahme der Menge von 13% detektierbar, während für die CR-Tiere eine signifikante Mengenzunahme von 44% zu beobachten ist. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

Die Gesamtsumme der ATP-Synthase, dargestellt in Abbildung 5.86, wird aus den Untereinheiten berechnet, die für alle Formen gefunden werden können. Dabei handelt es sich um die beiden größten Untereinheiten der ATP-Synthase,  $\alpha$  und  $\beta$ . Die detektierten Intensitäten dieser beiden Untereinheiten des Monomers und der gefundenen Oligomere Dimer, Trimer und Tetramer werden aufsummiert und können so besser miteinander verglichen werden. Dabei zeigt sich eine CR-bedingte Mengenabnahme der ATP-Synthase. Diese beträgt bei

---

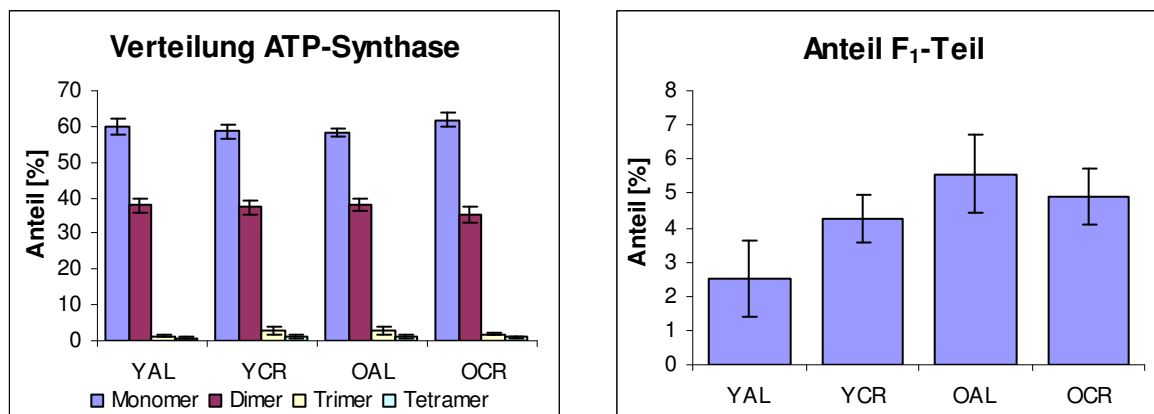
den jungen Tieren sehr deutliche 54% und bei den alten Tieren 23%, wobei nur die Mengenabnahme bei den jungen Tieren mit einem  $p$ -Wert von unter 0,01 eine Signifikanz aufweist. Bezüglich der Effekte, die mit dem Altern einhergehen, zeigt sich ein differenzierteres Bild. So ist für die *ad libitum* gefütterten Tiere eine leichte, jedoch nicht-signifikante Mengenabnahme von 13% zu beobachten, während im Gegensatz dazu die Tiere mit applizierter Kalorienrestriktion eine Mengenzunahme von 44% aufweisen, die mit einem  $p$ -Wert von unter 0,05 signifikant ist.

Neben der Gesamtmenge ist auch deren Verteilung auf die detektierbaren Formen der ATP-Synthase von Interesse. Diese Verteilung ist in Abbildung 5.87 (links) dargestellt, in der die Verteilung auf alle vertretenen Formen, das Monomer und und die oligomeren Formen Dimer, Trimer und Tetramer. Zusätzlich ist in Abbildung 5.87 (rechts) der Prozentsatz des freien  $F_1$ -Teils im Vergleich zur Gesamtmenge der ATP-Synthase abgebildet.

Es zeigt sich, dass das Monomer bei allen Gruppen mit Werten zwischen 58% und 62% den größten Anteil an der Gesamtmenge der ATP-Synthase ausmacht. Dabei kann für die OAL-Gruppe der geringste und für die OCR-Gruppe der größte Anteil des Monomers detektiert werden. Die beiden Gruppen der jungen Tiere zeigen mit Werten von 60% für die *ad libitum* gefütterten Tiere und 59% für die Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, einen noch geringeren Unterschied als die beiden Gruppen der alten Tiere mit 62% und 58%. Für das Dimer können ebenfalls nur sehr minimale Änderungen des Anteils detektiert werden. Die YAL- und die OAL-Gruppe haben einen Dimer-Anteil von 38% an der Gesamtmenge der ATP-Synthase, während die YCR-Gruppe einen um einen Prozentpunkt niedrigeren Wert aufweisen. Den geringsten Dimer-Anteil besitzt die OCR-Gruppe mit 35%. Für die Tri- und Tetramere sind größere Unterschiede detektierbar als bei den Anteilen der Monomere und Dimere. So zeigt sich bei den *ad libitum* gefütterten Tieren mit dem Alter ca. eine Verdopplung des Anteils der Trimere, für die jungen Tiere betragen die Anteile 1,4% für das Trimer und 2,7% für die alten Tiere. Der Anteil des Tetramers erhöht sich ebenfalls, allerdings nur um 0,4 Prozentpunkte ausgehend von 0,7%. Die YCR-Gruppe zeigt mit einem Anteil des Trimers von 3,0% den höchsten Wert der vier Gruppen und liegt damit bei mehr als dem Doppelten im Vergleich zur YAL-Gruppe. Auch für die Anteile des Tetramers können bei den jungen Tieren höhere Werte mit applizierter Kalorienrestriktion detektiert werden. So ist für das Tetramer ein Anstieg von 0,7% auf 1,1% zu beobachten, wenn die jungen Tiere einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden. Von allen untersuchten Anteilen können für das Tetramer die geringsten Änderungen detektiert werden. Nur die jungen *ad libitum* gefütterten Tiere zeigen einen mit 0,7% abweichenden Wert im Vergleich mit den anderen drei Gruppen, die alle einen Anteil zwischen 1,0% und 1,1% aufweisen. Im Gegensatz dazu gehören die

Anteile des Trimers zu den größten detektierbaren Änderungen bei der Verteilung der Gesamtheit an ATP-Synthase. Beim Vergleich des jeweils kleinsten und des jeweils größten Wertes kommt es zu etwas mehr als einer Verdopplung des entsprechenden Anteils.

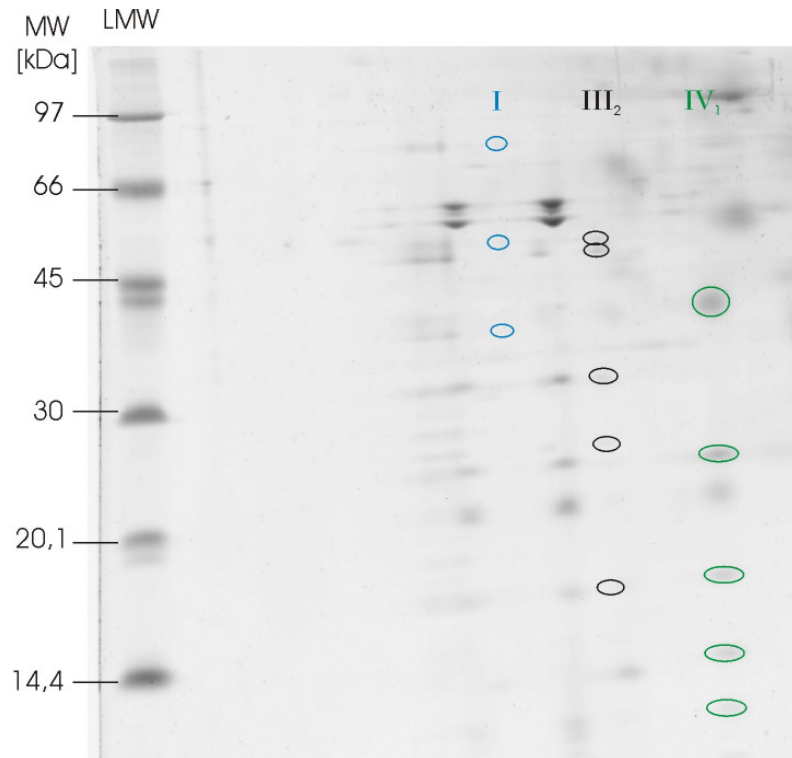
Die Menge von freiem F<sub>1</sub>-Teil zu der Gesamtmenge an der Gesamtmenge intakter ATP-Synthase spielt eine große Rolle. Wie bereits in Abbildung 5.85 gezeigt, kommt es sowohl zu einer Mengenzunahme der ATP-Synthase durch Altern als auch zu einer Mengenabnahme durch Kalorienrestriktion. Da die Gesamtmenge der ATP-Synthase jedoch CR-bedingt abnimmt, ergibt sich für beide Alterstufen eine Erhöhung des Anteils an ATP-hydrolysierendem F<sub>1</sub>-Teil mit Kalorienrestriktion im Vergleich zu den jungen Tieren, welche mit 2,5% den deutlich geringsten Wert aufweisen. Im Gegensatz dazu kann für die OAL-Gruppe mit 5,6% der höchste Anteil detektiert werden.



**Abb. 5.87:** Verteilung der Gesamtmenge der ATP-Synthase aus Hirnmitochondrien auf deren detektierbare Formen bestehend aus Monomer sowie der Oligomere Dimer, Trimer und Tetramer (links), sowie der Anteil von freiem F<sub>1</sub>-Teil (rechts) verglichen mit der ATP-Synthase-Gesamtmenge. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Monomer bei allen Gruppen mit Anteilen zwischen 58% und 62% die vorherrschende Form der ATP-Synthase darstellt, während das Dimer mit Anteilen von 34% bis 37% in deutlich geringerer Menge vorkommt als das Monomer. Der Prozentsatz des F<sub>1</sub>-Teils in Relation zur Gesamtmenge der ATP-Synthase zeigt eine altersbedingte Erhöhung. Die jungen Tiere zeigen mit Abstand den geringsten Anteil von nur 2,5%, während die alten den höchsten Anteil mit 5,6% aufweisen.

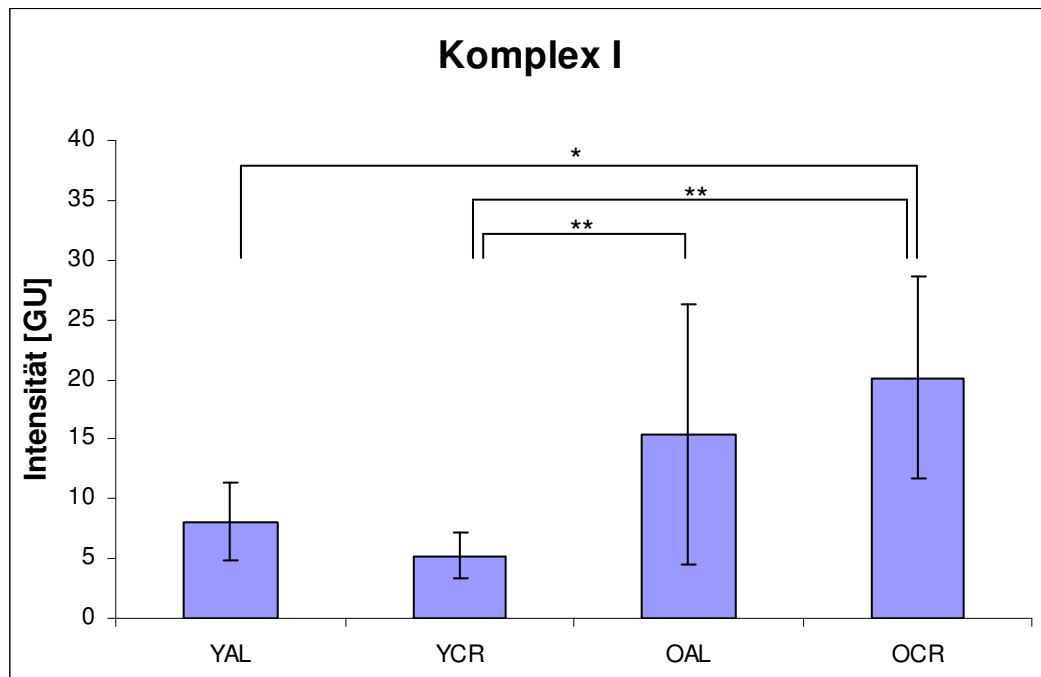
### 5.5.3.2 Individuelle Komplexe

Von den individuellen Komplexen der Atmungskette können Komplex I, Komplex III<sub>2</sub> und Komplex IV auf den 2D-Gelen detektiert werden. Zu Komplex I können drei Untereinheiten zugeordnet werden, während sich für die Komplexe III<sub>2</sub> und IV auf den 2D-Gelen sogar fünf Untereinheiten detektieren und quantifizieren lassen. Alle zu einem Komplex zugehörigen Untereinheiten werden für die folgenden Darstellungen der Menge aufsummiert. Die exakte Lage dieser quantifizierten Untereinheiten ist in Abbildung 5.88 dargestellt.



**Abb. 5.88:** Ausschnitt eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO<sup>®</sup> Ruby gefärbten 2D-Gels der untersuchten Hirnmitochondrien. Die markierten Proteinspots zeigen die quantifizierten Untereinheiten von Komplex I (blau), Komplex III<sub>2</sub> (schwarz) und Komplex IV (grün).

Die Summen der drei detektierten und quantifizierten Untereinheiten von Komplex I, dargestellt in Abbildung 5.89, weisen alle mit maximal 20 GU für die OCR-Gruppe sehr niedrige Intensitäten auf. Des Weiteren ist zu sehen, dass ein alternsbedingter Anstieg der Menge von Komplex I sowohl für die *ad libitum* gefütterten Tiere als auch für diejenigen Tiere detektierbar ist, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden. Es handelt sich bei den *ad libitum* gefütterten Tieren um eine Mengenzunahme von 90%, für die allerdings aufgrund der extrem hohen Standardabweichungen der OAL-Gruppe keine Signifikanz festgestellt werden kann. Für die beiden Gruppen der Tiere mit applizierter Kalorienrestriktion kann sogar eine Zunahme der Komplex I-Menge von 284% detektiert werden. Das heißt, dass für die alten CR-Tiere ein Wert ermittelt werden kann, der das Vierfache der Komplex I-Menge bei den jungen Tieren mit applizierter Kalorienrestriktion darstellt. Diese enorme Zunahme zeigt mit einem *p*-Wert von unter 0,01 im Gegensatz zur der detektierten Mengenzunahme der *ad libitum* gefütterten Tiere eine hohe Signifikanz. Die Effekte der Kalorienrestriktion stellen sich sehr uneinheitlich dar. Während für die jungen Tiere eine CR-bedingte Abnahme der Menge von Komplex I von 35% zeigen, kann für die alten Tiere eine leichte Mengenzunahme von 31% mit applizierter Kalorienrestriktion detektiert werden. Beide Änderungen zeigen jedoch keine Signifikanz.

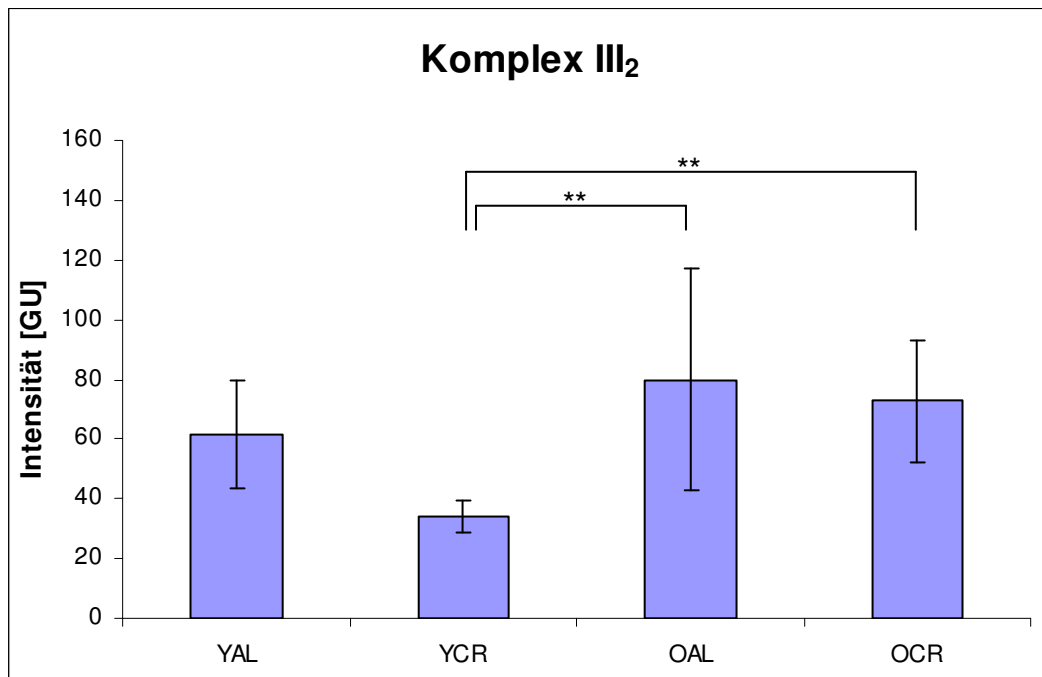


**Abb. 5.89:** Gesamtmenge von individuellem Komplex I aus Hirnmitochondrien. Es zeigen sich bei beiden Ernährungsformen deutliche altersbedingte Mengenzunahmen, die für die *ad libitum* gefütterten Tiere nicht-signifikante 90% und für die Tiere mit Kalorienrestriktion sogar signifikante 284% betragen. Die jungen Tiere zeigen infolge der Kalorienrestriktion eine Mengenabnahme von 35%, während die alten Tiere eine CR-bedingte Zunahme von 31% aufweisen, allerdings sind beide Änderungen nicht signifikant.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

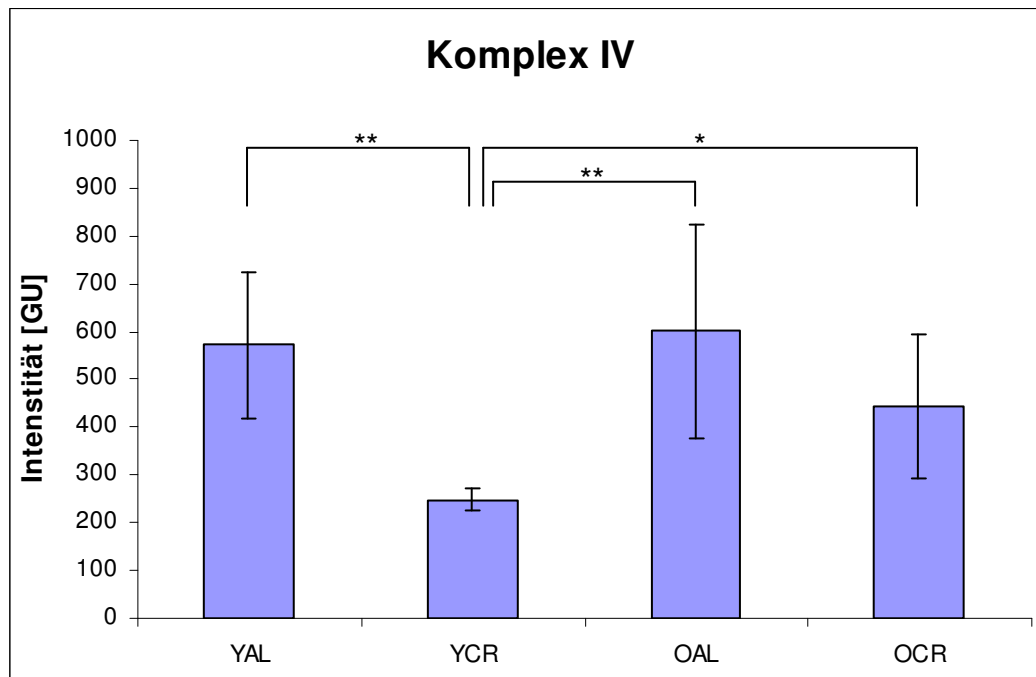
Für individuellen Komplex III<sub>2</sub>, dargestellt in Abbildung 5.90, kann ebenfalls wie bereits für Komplex I gezeigt, ein altersbedingter Anstieg der Menge beobachtet werden. Dieser fällt für die *ad libitum* gefütterten Tiere mit nicht-signifikanten 29% noch recht gering aus, jedoch ist für die beiden Gruppen der Tiere mit Kalorienrestriktion eine sehr deutliche Zunahme von 112% detektierbar. Dies bedeutet, dass sich die Menge von individuellem Komplex III<sub>2</sub> mit dem Alter bei gleichzeitiger Kalorienrestriktion etwas mehr als verdoppelt. Diese sehr ausgeprägte Änderung ist im Gegensatz zu der Mengenzunahme bei den *ad libitum* gefütterten Tieren mit einem  $p$ -Wert von unter 0,01 signifikant. Des Weiteren kann für beide Altersstufen eine Abnahme von individuellem Komplex III<sub>2</sub> infolge einer Kalorienrestriktion detektiert werden. Diese liegt für die jungen Tiere bei deutlichen, jedoch nicht-signifikanten 44% und für die alten Individuen bei minimalen, ebenfalls nicht-signifikanten 9%.





**Abb. 5.90:** Gesamtmenge von individuellem Komplex III<sub>2</sub> aus Hirnmitochondrien. Es zeigen sich bei beiden Ernährungsformen teils deutliche altersbedingte Mengenzunahmen, die für die *ad libitum* gefütterten Tiere nicht-signifikante 29% und für die Tiere mit Kalorienrestriktion sogar signifikante 112% betragen. Die jungen Tiere zeigen infolge der Kalorienrestriktion eine Mengenabnahme von 44%, während die alten Tiere nur einen minimalen Rückgang der Menge von 9% aufweisen. Beide Änderungen infolge der Kalorienrestriktion sind jedoch nicht signifikant. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei n = 5 für die jungen und n = 6 für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 )

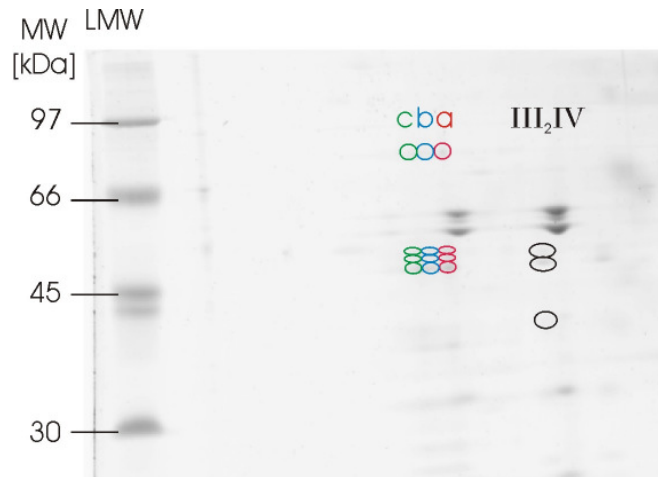
Der individuelle Komplex IV kann auf den 2D-Gelen der Mitochondrien aus Rattenhirn ausschließlich in seiner monomeren Form detektiert werden, dessen quantifizierten Mengen in Abbildung 5.91 dargestellt sind. Im Vergleich zu den Komplexen I und III<sub>2</sub>, die maximale Intensitätswerte von 20 GU bzw. 80 GU aufweisen, kann für Komplex IV mit Werten von bis zu ca. 600 GU eine deutlich größere Menge an individuell vorliegenden Einzelkomplexen gefunden werden. Es zeigt sich für die beiden Gruppen der *ad libitum* gefütterten Individuen keine Mengenänderung infolge des Alterns, während für die Gruppen der Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, eine altersbedingte Zunahme der Menge an Komplex IV von signifikanten 79% detektiert werden kann. Des Weiteren ist für beide Altersstufen eine teils deutliche Mengenabnahme aufgrund der applizierten Kalorienrestriktion zu beobachten. Dieser Rückgang der Komplex IV-Menge beträgt bei den jungen Individuen 56% und zeigt mit einem p-Wert von unter 0,01 eine deutliche Signifikanz. Bei den alten Tieren lässt sich eine weniger ausgeprägte Abnahme von 26% infolge der Kalorienrestriktion detektieren, die aufgrund der recht hohen Standardabweichung der OCR-Gruppe keine Signifikanz aufweist.



**Abb. 5.91:** Gesamtmenge von individuellem Komplex IV aus Hirnmitochondrien. Es zeigt sich mit dem Alter bei den *ad libitum* gefütterten Tieren keine Änderung, während für die CR-Tiere ein altersbedingter Anstieg der Menge von signifikanten 79% detektierbar ist. Infolge einer Kalorienrestriktion kann für beide Altersstufen eine Mengenabnahme beobachtet werden, die für die jungen Individuen signifikante 56% beträgt und für die alten Tiere bei 26% liegt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

### 5.5.3.3 Superkomplexe

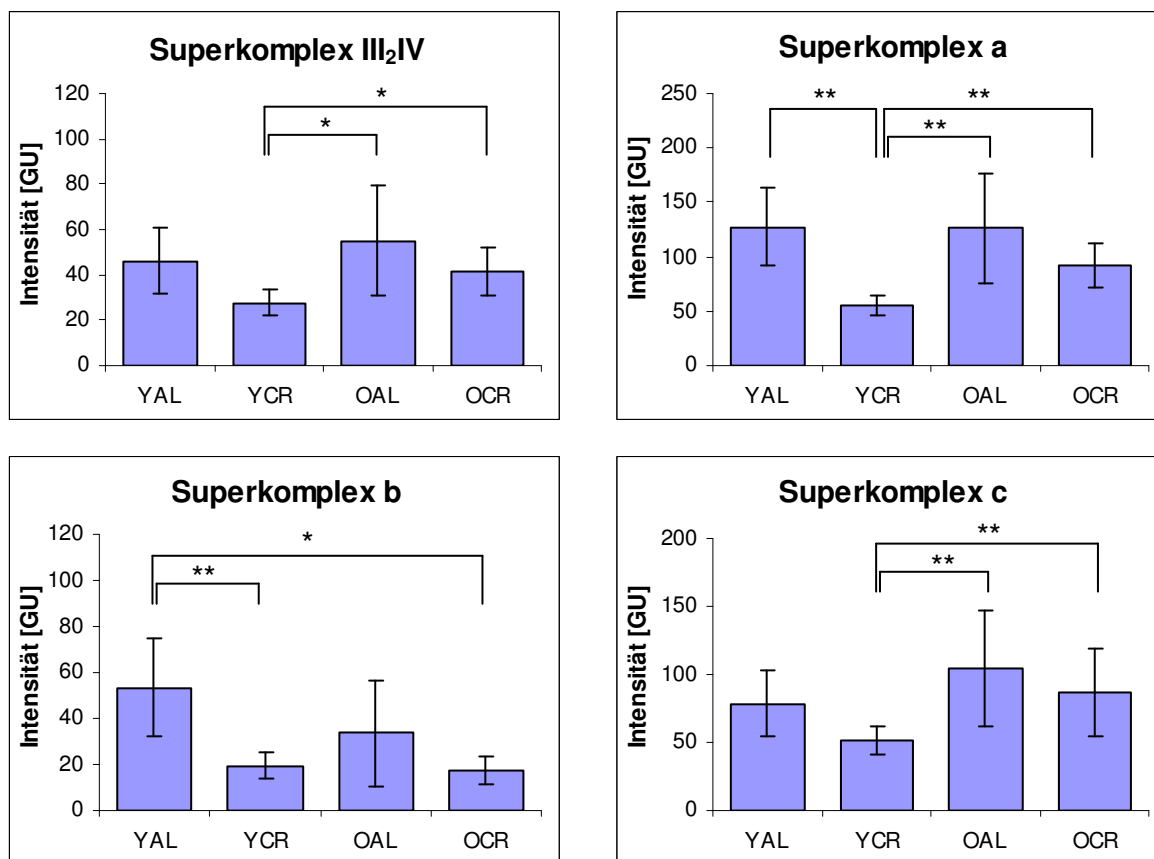
In den hier untersuchten Mitochondrien aus dem Cerebrum von Fischer-Ratten können vier verschiedene Superkomplexe detektiert und somit auch quantifiziert werden. Bei diesen handelt es sich um den kleinsten bisher in Mitochondrien aus Rattengewebe gefundenen Superkomplex  $\text{III}_2\text{IV}$ , von dem drei Untereinheiten den jeweiligen Proteinspots in den 2D-Gelen zugeordnet werden können, und die Superkomplexe a bis c, die aus jeweils einer Kopie von Komplex I und einem Homodimer von Komplex III mit einer aufsteigenden Anzahl an Kopien für Komplex IV bestehen. Superkomplex a besitzt keine Komplex IV-Kopie, während in den beiden Superkomplexen b und c eine bzw. zwei Kopien von Komplex IV vorhanden sind. In den angefertigten 2D-Gelen konnten jeweils vier Untereinheiten den entsprechenden Superkomplexen zugeordnet werden. Die Lage der detektierten und quantifizierten Untereinheiten der analysierten Superkomplexe ist in Abbildung 5.92 dargestellt.



**Abb. 5.92:** Ausschnitt eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby gefärbten 2D-Gels der untersuchten Hirnmitochondrien. Die markierten Proteinspots zeigen die quantifizierten Untereinheiten von Superkomplex III<sub>2</sub>IV (schwarz), Superkomplex a (rot), Superkomplex b (blau) und Superkomplex c (grün).

Für den Superkomplex III<sub>2</sub>IV können die beiden Komplex III-Untereinheiten Core I und Core II, sowie COX 1 von Komplex IV detektiert werden. Die beiden Untereinheiten von Komplex III können neben den Untereinheiten Fe-S-Protein und Flavo-Protein von Komplex I ebenfalls in den Superkomplexen a bis c gefunden werden, während COX 1 für diese Superkomplexe nicht detektiert werden kann. Für den Vergleich zwischen den Gruppen werden alle detektierbaren Untereinheiten aufsummiert und in Abbildung 5.93 dargestellt. Superkomplex III<sub>2</sub>IV zeigt für beide Ernährungsformen leichte Mengenzunahmen mit dem Alter. Diese liegen bei 19% für die *ad libitum* gefütterten Tiere und bei 51% für die Individuen, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, jedoch weist nur die letztgenannte Änderung eine Signifikanz auf. Es können ebenfalls CR-bedingte Abnahmen für beide Altersstufen bei dem kleinen Superkomplex festgestellt werden, welche bei 40% für die jungen Tiere und bei 24% für die alten Individuen, jedoch sind beide Änderungen nicht signifikant. Für Superkomplex a hingegen kann für die *ad libitum* gefütterten Ratten keine Änderung detektiert werden, während sich für die CR-Tiere eine signifikante Erhöhung der Superkomplex-Menge von 66% infolge des Alterns ergibt. Als Folge der Kalorienrestriktion kann für beide Altersstufen eine Abnahme der Menge an Superkomplex a beobachtet werden, die für die jungen Tiere bei signifikanten 57% liegt und für die alten Individuen 27% beträgt. Die Mengen von Superkomplex b zeigen für die *ad libitum* gefütterten Tiere eine Abnahme von 39%, während für die CR-Tiere keine Änderung infolge des Alterns festzustellen ist. Allerdings zeigen beide Altersstufen eine Mengenabnahme aufgrund der applizierten Kalorienrestriktion mit Werten von signifikanten 64% für die jungen Tiere und 48% für die alten Individuen. Im Gegensatz dazu zeigt Superkomplex c die gleichen Tendenzen wie Superkomplex III<sub>2</sub>IV. Auch hier können für beide Ernährungsformen altersabhängige

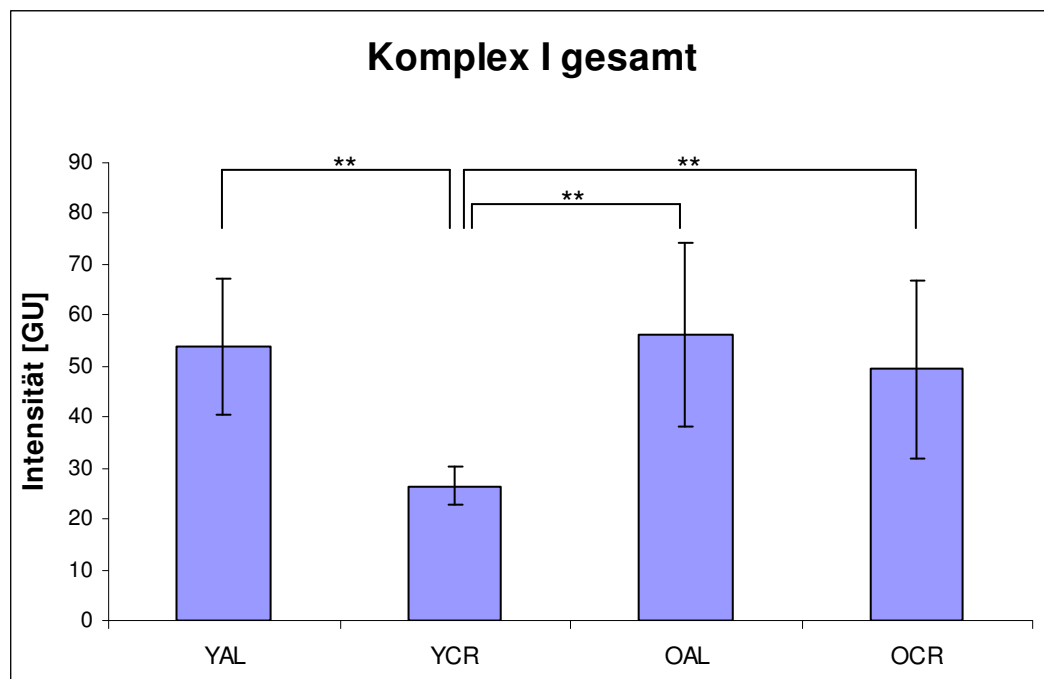
Anstiege in der Menge detektiert werden, die für die *ad libitum* gefütterten Ratten 33% und für die Tiere mit applizierter Kalorienrestriktion 68% betragen, wobei nur die letztgenannte Änderung eine Signifikanz aufweist. Die applizierte Kalorienrestriktion resultiert in nicht-signifikanten Mengenabnahmen von 35% für die jungen Tiere und 17% für die alten Individuen. Für alle untersuchten Superkomplexe zeigen bis auf eine Ausnahme ausschließlich diejenigen Änderungen eine Signifikanz, an der die YCR-Gruppe beteiligt ist. In drei von vier Superkomplexen zeigt die YCR-Gruppe die geringste Menge, einzig bei Superkomplex b kann für eine weitere Gruppe (OCR) ein ebenso niedriger Wert ermittelt werden.



**Abb. 5.93:** Gesamtmenge der detektierbaren Superkomplexe III<sub>2</sub>IV und a bis c aus Hirnmitochondrien. Für alle untersuchten Superkomplexe kann eine signifikant niedrigere Menge für die YCR-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen beobachtet werden. Ebenso können bei allen Superkomplexen teils sehr deutliche Mengenabnahmen infolge einer Kalorienrestriktion für beide Altersstufen detektiert werden, von denen allerdings meist nur die Änderung bei den jungen Tieren signifikant ist. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei n = 5 für die jungen und n = 6 für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 )

In den Superkomplexen a bis c können jeweils zwei Untereinheiten von Komplex I gefunden werden. Da nicht nur die Menge des individuellen Komplexes und der einzelnen Superkomplexe von Interesse ist, sondern ebenfalls die Gesamtmenge an Komplex I, unabhängig

von der Form, in der er vorliegt, kann durch Aufsummieren der Eisen-Schwefel-Untereinheit (Fe-S-Protein) aus individuellem und in Superkomplexen gebundenem Komplex I dessen Gesamtmenge ermittelt werden (Abbildung 5.94). Obwohl ebenfalls die Flavo-Untereinheit sowohl für den individuellen Komplex als auch für die Superkomplexe detektiert werden kann, wird diese nicht für die Gesamtsumme an Komplex I herangezogen, da diese Untereinheit bei den Superkomplexen schwer von der Core I-Untereinheit aus Komplex III zu trennen ist. Neben der Gesamtmenge von Komplex I ist auch deren Verteilung auf die gefunden Formen interessant, da in Hirngewebe von Ratten in bisherigen Untersuchungen Komplex I zu über 90% mit anderen Komplexen der Atmungskette zu Superkomplexen assoziiert gefunden wurde<sup>[104, 118]</sup>. Die Verteilung für die hier analysierten Mitochondrien aus Cerebrumgewebe ist in Abbildung 5.95 dargestellt.



**Abb. 5.94:** Gesamtmenge der Fe-S-Untereinheit von Komplex I aus Hirnmitochondrien. Es zeigt sich für die YCR-Gruppe eine signifikant geringere Menge an Komplex I im Vergleich zu den Gruppen YAL, OAL und OCR. Für diese drei Gruppen können nur sehr minimale Änderungen der Komplex I-Menge detektiert werden, die allerdings keine Signifikanz aufweisen und daher nicht als reale Veränderungen der Proteinmenge *in vivo* angesehen werden können.

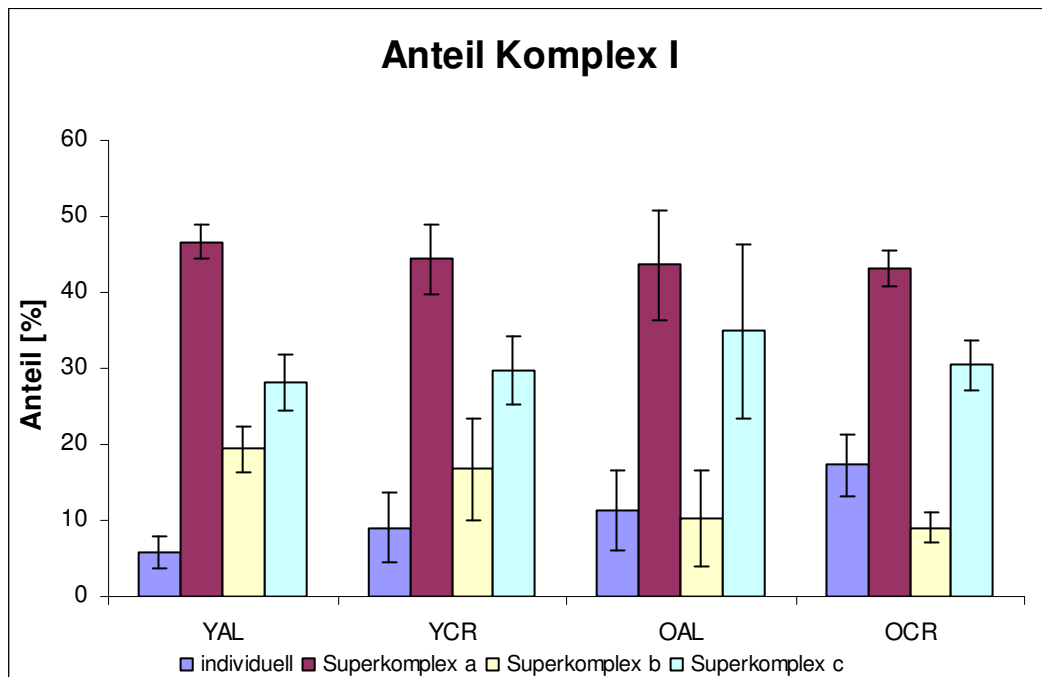
Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

Die Gesamtmenge von Komplex I zeigt wie für die einzelnen Superkomplexe eine sehr deutliche signifikante Mengenabnahme bei den jungen Tieren, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, im Vergleich zu den anderen drei untersuchten Gruppen. Diese zeigen mit Werten zwischen 49 GU und 56 GU nur minimale Änderungen, die aufgrund der sehr

---

hohen Standardabweichungen nicht signifikant sind und damit nicht als reale Änderungen *in vivo* angenommen werden können. Durch die geringe Menge an Komplex I der YCR-Gruppe ergibt sich beim Vergleich der jungen Tiere eine Mengenabnahme von 51% aufgrund der Kalorienrestriktion. Ebenso kann infolgedessen für die Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, ein altersbedingter Anstieg von 87% detektiert werden.

Betrachtet man die Verteilung der Gesamtmenge von Komplex I auf dessen detektierbare Formen zeigt sich, dass sich die Anteile der Superkomplexe a und c zwischen den Gruppen kaum ändern. Es sind hauptsächlich die Anteile des individuellen Komplexes und des Superkomplexes b, die deutlichen Änderungen, sowohl mit dem Alter als auch mit applizierter Kalorienrestriktion, unterworfen sind. Superkomplex a ist bei allen Gruppen mit Anteilen von 43% bis zu 47% diejenige Form, in der der größte Teil von Komplex I vorliegt, gefolgt von Superkomplex c. Bei den Gruppen YAL, YCR und OCR verändert sich dessen Anteil kaum und liegt für diese drei Gruppen bei 28% bis 31%. Einzig für die OAL-Gruppe zeigt sich eine etwas deutlichere Erhöhung des Anteils im Vergleich zu den anderen Gruppen um maximal 7 Prozentpunkte auf 35%. Für beide Ernährungsformen ist ein Anstieg des Anteils von individuellem Komplex I mit dem Alter feststellbar, der mit einem Rückgang des Anteils von Superkomplex b einhergeht. Während die jungen *ad libitum* gefütterten Tiere mit 6% den niedrigsten Wert aller Gruppen für den individuellen Komplex aufweist, steigt der Anteil mit dem Alter um 5 Prozentpunkte auf einen Wert von 11% an. Gleichzeitig sinkt der Wert von Superkomplex b von 19% für die YAL-Gruppe auf nur noch 10% für die OAL-Gruppe. Auch bei den Tieren mit Kalorienrestriktion kommt es zu einem Anstieg des Anteils von individuellem Komplex I. Für die jungen Tiere liegt der Anteil bei 9% und steigt infolge des Alterns um 8 Prozentpunkte auf einen fast doppelt so hohen Wert von 17%. Einhergehend mit dieser Zunahme zeigt Superkomplex b exakt die gleichen Anteile, jedoch kommt es durch das Altern zu einem Abnahme der Werte von 17% für die YCR-Gruppe auf nur noch 9% für die OCR-Gruppe. Die Effekte, die durch die Kalorienrestriktion auftreten, sind weit weniger deutlich als die des Alterns. So sind zwar wie schon für das Altern Erhöhungen des Anteils von individuellem Komplex I und eine gleichzeitige Verminderung von Superkomplex b zu detektieren, jedoch sind diese Änderungen nicht so stark ausgeprägt wie bei den zuvor beschriebenen Effekten des Alterns. So ist für die jungen Tiere eine Zunahme des Anteils von 6% auf 9% für den individuellen Komplex zu beobachten, während der Superkomplex b-Anteil von 19% auf 17% absinkt. Ebenso kann für die alten Tiere mit einem Anteil von 11% für die OAL-Gruppe eine Erhöhung von individuellem Komplex von 6 Prozentpunkten auf 17% für die alten Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, detektiert werden. Der Anteil von Superkomplex b fällt infolge der Kalorienrestriktion von 10% auf 9%.

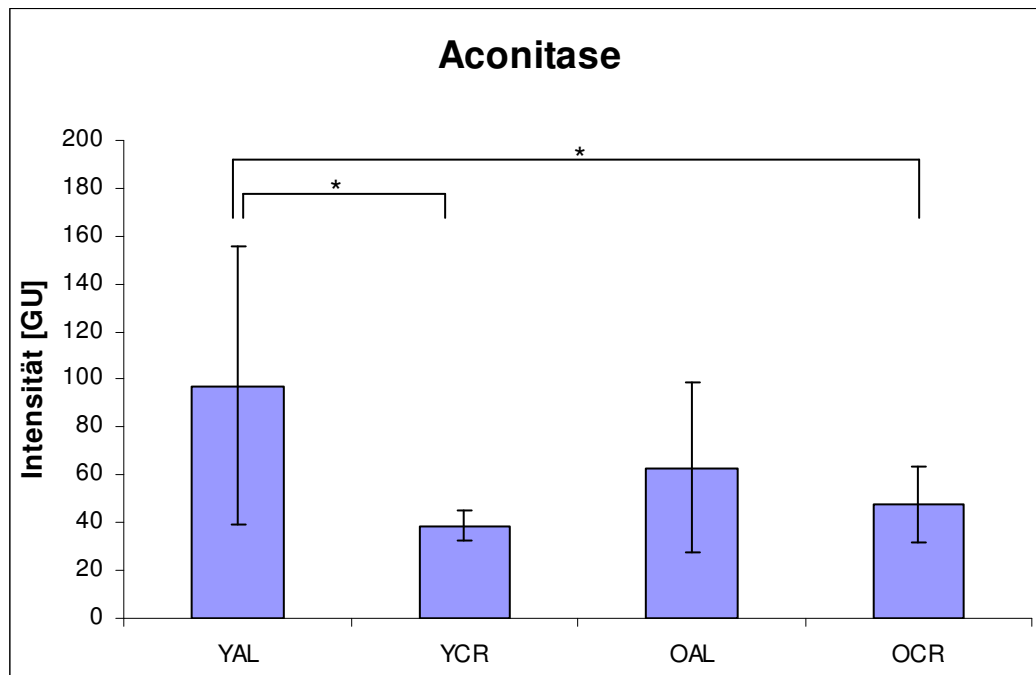


**Abb. 5.95:** Anteile der verschiedenen Formen von Komplex I an dessen Gesamtmenge. Es zeigt sich, dass das Altern und eine Kalorienrestriktion nur minimalen Einfluss auf die Anteile sowohl von Superkomplex a als auch von Superkomplex c hervorruft, während die Anteile des individuellen Komplexes und die des Superkomplexes b deutlich größeren Änderungen unterworfen sind. Mit dem Alter kommt es bei beiden Ernährungsformen zu einer Erhöhung des Anteils von individuellem Komplex I und einem damit einhergehenden Rückgang des Anteils von Superkomplex b.

#### 5.5.3.4 Nicht-OxPhos-Proteine

In den 2D-Gelen der untersuchten Rattenhirnmitochondrien können einige Proteine gefunden werden, die in den Mitochondrien(-membranen) lokalisiert sind, jedoch kein Teil der Atmungskette darstellen. Unter diesen ist nur ein einziges Protein, das ebenfalls in den Herzmitochondrien der gleichen Ratten gefunden werden konnte. Daher werden aufgrund des Vergleichs der beiden Gewebe nur die Mengen dieses einen Proteins gezeigt, bei dem es sich um die Aconitase handelt. Alle anderen gefundenen mitochondrialen Proteine sind in der Diplomarbeit von Michaela Söhn<sup>[91]</sup> gezeigt und können dort eingesehen werden. Die Mengenänderungen der Aconitase zwischen den vier untersuchten Gruppen sind in Abbildung 5.96 dargestellt.

Die Aconitase zeigt bei den *ad libitum* gefütterten Tieren eine Mengenabnahme von 35%, die allerdings nicht signifikant ist. Für die Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, kann ein ebenfalls nicht-signifikante Zunahme der Aconitase-Menge von 23% detektiert werden. Für beide Altersstufen lässt sich eine Abnahme beobachten, die für die jungen Tiere bei 60% und für die alten Tiere bei 24% liegt, allerdings zeigt nur die Mengenabnahme bei den jungen Tieren mit einem *p*-Wert von unter 0,05 eine Signifikanz.



**Abb. 5.96:** Menge der Aconitase in den untersuchten Hirnproben. Es zeigt sich für beide Altersstufen eine CR-bedingte Mengenabnahme, die für die jungen Tiere bei signifikanten 60% und für die alten Tiere bei 24% liegt. Zusätzlich lässt sich für die *ad libitum* gefütterten Tiere eine altersbedingte Mengenabnahme und für die CR-Tiere eine Zunahme detektieren, die jedoch beide nicht signifikant sind.

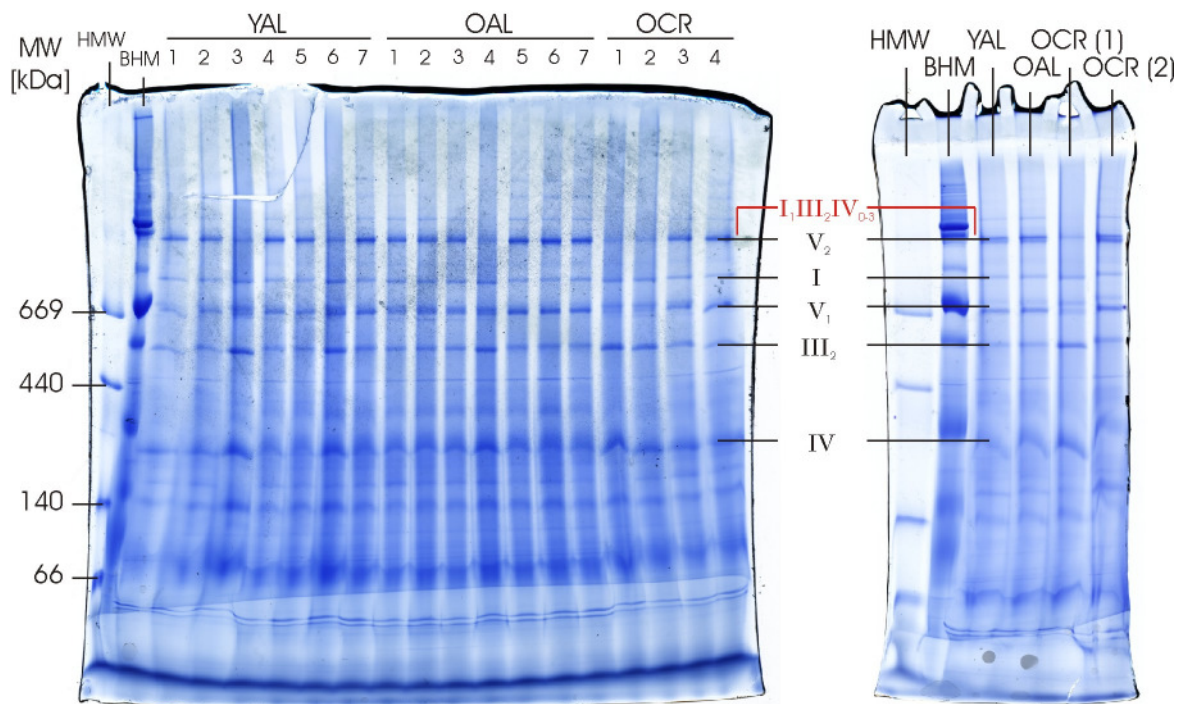
Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts bei  $n = 5$  für die jungen und  $n = 6$  für die alten Individuen. (Signifikanzwerte für \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  )

#### 5.5.4 Leber

Bei den hier untersuchten Leberproben handelt es sich um drei verschiedene Gruppen von Ratten. Es wurde eine Analyse des mitochondrialen Proteoms von jungen und alten Tieren, sowie alten Ratten, die zwei Monate vor ihrem Tod einer kurzzeitigen Kalorienrestriktion unterzogen wurden, durchgeführt. In dieser Arbeit wurden die Mitochondrien der Tiere einer Gruppe für die Untersuchungen gepoolt. Je drei Individuen jeder Gruppe wurden bereits zuvor von mir in meiner Diplomarbeit<sup>[92]</sup> analysiert, da jedoch ein Tier der Gruppe der jungen Tiere ein deutlich abweichendes Proteinmuster sowohl in der ersten als auch in der zweiten Dimension zeigte, wurde diese Probe aus der Gruppe eliminiert. Solch drastische Veränderungen des Proteinprofils lassen auf pathologische Veränderungen schließen. Dadurch standen für die Gruppe der jungen Tiere nur noch zwei Proben zur Verfügung, was natürlich keine ausreichende Probenmenge für die Statistik darstellt. Daher wurden weitere Lebergewebe-Proben von der Arbeitsgruppe um Prof. Goto aus Japan zur Verfügung gestellt, um die Anzahl der Proben zu steigern. Die YAL-Gruppe wurde um drei weitere Individuen erweitert, die OAL-Gruppe um vier und die OCR-Gruppe um ein Individuum. Da



es sich bei den Leberproben nicht um das komplette Organ handelt, sondern nur etwa die Hälfte dessen umfasst, wurde zusätzlich zu den neuen drei Individuen der YAL-Gruppe die zweite Hälfte der Leberprobe des jungen Tieres mit abweichendem Proteinmuster angefordert. Dieses wurde nochmals untersucht, um auszuschließen, dass das abweichende Proteinmuster aus einer nachträglichen Behandlung der isolierten Mitochondrien resultiert.



**Abb. 5.97:** BN-Gele der Mitochondrien aus Rattenleber aller untersuchten Proben (links) und deren Pools (rechts). Es zeigt sich, dass in der YAL-Gruppe die Spuren 3 und 6 ein abweichendes Bandenmuster aufweisen. Es handelt sich dabei um Proben des selben Individuums und wird in nachfolgenden Analysen nicht berücksichtigt. Dies gilt ebenfalls für das Individuum, dessen Mitochondrien in Spur 4 der OAL-Gruppe aufgetragen wurden. Die OCR-Gruppe zeigt zu gleichen Teilen zwei verschiedene Bandenmuster. Aufgrund dessen werden aus der OCR-Gruppe, die ursprünglich vier Individuen umfasst, zwei Gruppen von je zwei Tieren gebildet, die getrennt von einander untersucht werden. Die Probenpools der YAL- und der OAL-Gruppe umfassen 5 bzw. 6 Individuen.

Die Mitochondrien wurden mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 8g/g solubilisiert. Pro Spur wurden 70 µg Protein vor Solubilisierung aufgetragen. Individuelle Komplexe sind schwarz markiert, Superkomplexe rot.

Nach Isolierung der Mitochondrien aus den neuen Gewebeproben wurden diese einzeln in einem BN-Gel aufgetrennt, um die Gleichartigkeit der Proben sicherzustellen. Die Abbildung 5.97 zeigt auf der linken Seite das BN-Gel der Einzelproben. Es ist zu erkennen, dass die Spuren 3 und 7 der YAL-Proben ein abweichendes Bandenmuster im Vergleich mit den anderen Proben zeigt. Dabei handelt es sich um das gleiche Tier, das bereits in meiner Diplomarbeit ein abweichendes Bandenmuster zeigte (Spur 3) und die nachträglich angeforderte zweite Hälfte der gleichen Gewebeprobe (Spur 7). Das entsprechende junge

---

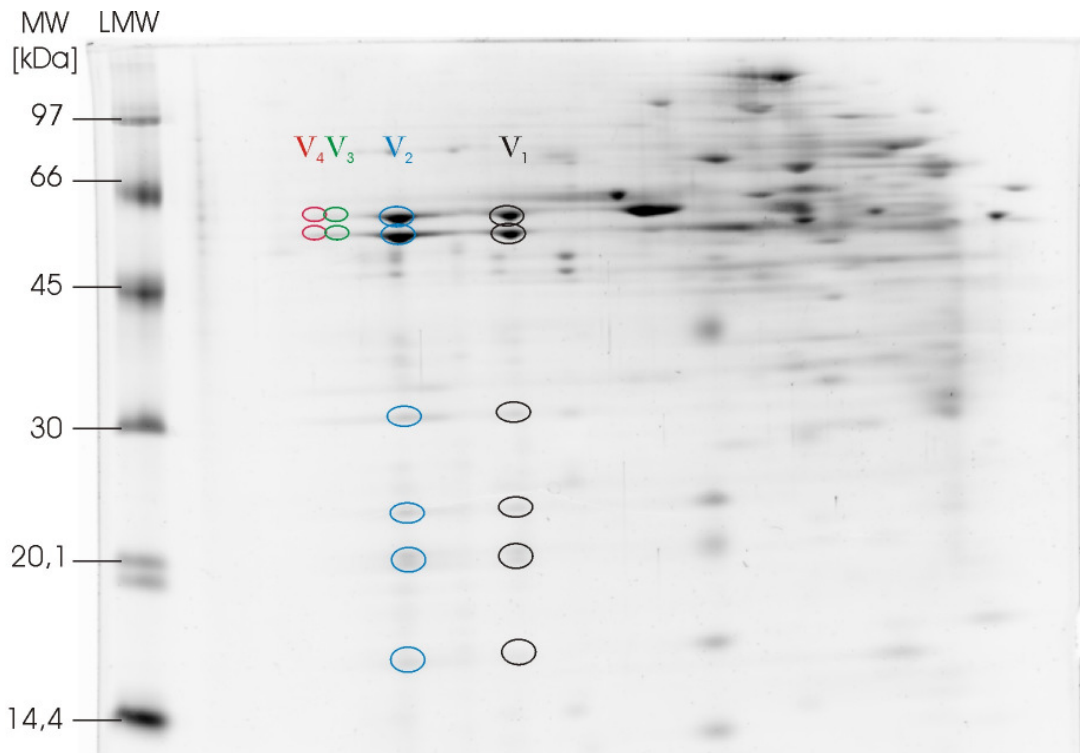
Individuum wurde aus der Analyse eliminiert, ebenso wie das Individuum der Spur 4 der OAL-Proben, das ebenfalls ein deutlich verändertes Bandenmuster zeigt. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Individuen um ernsthaft erkrankte Tiere handelt und damit nicht den Normalzustand von jungen bzw. alten Ratten darstellen. Von den vier untersuchten Proben der OCR-Gruppe weisen je zwei Individuen das gleiche Bandenmuster auf (Spur 1 & 2, und Spur 3 & 4 der OCR-Proben). Da aufgrund der Verteilung in zwei gleich große Gruppen nicht entschieden werden kann, welches Bandenmuster den ‚Normalzustand‘ bzw. den Phänotyp eines kranken Tieres widerspiegelt, werden alle vier Individuen weiter analysiert, allerdings in zwei Gruppen aufgeteilt. Für die im Folgenden dargestellte Analyse des mitochondrialen Proteoms aus Rattenleber werden die Proben der gleichen Gruppe zusammen als Probenpool untersucht. Dabei ergibt sich für die YAL-Gruppe ein Probenpool, der nach Eliminierung des vermutlich kranken Tieres fünf Individuen umfasst, während die OAL-Gruppe aus sechs Individuen besteht, nachdem auch bei dieser Gruppe ein Individuum nicht berücksichtigt werden kann. Die OCR-Gruppe wird aufgrund der gleichverteilten verschiedenen Bandenmuster in zwei Gruppen von je zwei Individuen aufgeteilt, welche im Folgenden als OCR (1) und OCR (2) bezeichnet werden. Von den vier Probenpools, die in einem BN-Gel auf der rechten Seite der Abbildung 5.97 dargestellt sind, werden jeweils 3 Gele der 2. Dimension angefertigt, dementsprechend basiert die Analyse des mitochondrialen Proteoms aus Rattenleber auf 12 2D-BN/SDS-Gelen.

Die untersuchten Proteinspots auf den 2D-Gelen wurden aufgrund von verschiedenen MALDI-Analysen mittels PMF (peptide mass fingerprinting) in der Arbeitsgruppe Dencher identifiziert und konnten so den dazugehörigen Proteinkomplexen zugeordnet werden. Der Großteil dieser Proteine und Proteinuntereinheiten wurde von Reifschneider<sup>[93, 110]</sup> identifiziert, zudem konnte von mir bereits in meiner Diplomarbeit<sup>[92]</sup> die Lage von einigen Proteinen und Proteinuntereinheiten verifiziert werden. Des Weiteren dienten das in der Arbeitsgruppe sehr gut charakterisierte Rinderherz und *In-Gel*-Aktivitätstests der untersuchten Proben als Hilfe bei der Zuordnung von Komplexen und deren Superkomplexen.

Da es sich bei der hier durchgeführten Analyse um Probenpools handelt und jeweils drei technische Replikate hergestellt wurden und damit die Probenmenge sehr klein ist, können keine statistischen Berechnungen durchgeführt werden, die Signifikanzen der detektierten Änderungen aufzeigen könnten. Die angegebenen Fehlerbalken in den nachfolgenden Diagrammen zeigen die Standardabweichungen der Replikate und stellen allein den technischen Fehler dar, da durch das Poolen der Einzelindividuen vor der Analyse bereits künstlich ein Mittelwert aller Individuen einer Gruppe generiert wird und damit kein individueller Fehler detektierbar ist.

#### 5.5.4.1 ATP-Synthase

Die ATP-Synthase, auch Komplex V der oxidativen Phosphorylierung genannt, kann in den hier untersuchten 2D-Gelen der Mitochondrien aus Rattenleber sowohl in ihrer monomeren Form als auch in den oligomeren Formen Di-, Tri- und Tetramer detektiert werden. Die Lage der quantifizierten Untereinheiten der verschiedenen Formen der ATP-Synthase ist in Abbildung 5.98 dargestellt.



**Abb. 5.98:** Ausschnitt eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby gefärbten 2D-Gels (OAL-Gruppe) der untersuchten Mitochondrien aus Rattenleber. Die markierten Proteinspots zeigen Untereinheiten der ATP-Synthase, die neben dem Monomer (schwarz) auch in den oligomeren Formen Dimer (blau), Trimer (grün) und Tetramer (rot) in den hergestellten 2D-Gelen detektiert werden kann.

In Abbildung 5.98 ist zu erkennen, dass sowohl von den Monomeren als auch von den Dimeren sechs Proteinspots der ATP-Synthase zugeordnet werden können. Dabei handelt es sich um die beiden größten Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ , die ebenfalls für das Trimer und das Tetramer gefunden werden können, sowie die Untereinheiten  $\gamma$ ,  $b$ , OSCP und  $d$ . Häufig kann wie bereits für die Mitochondrien aus Rattenherz und -hirn gezeigt, der freie  $F_1$ -Teil der ATP-Synthase detektiert werden. Dies ist für die hier untersuchten Lebermitochondrien jedoch nicht möglich. Die  $\alpha$ -Untereinheit des freien  $F_1$ -Teils wird komplett von einem anderen Proteinspot überlagert, während die  $\beta$ -Untereinheit zwar detektierbar ist, sich jedoch in einem recht ausgeprägten Proteinschmier befindet. Damit ist die Quantifizierung sehr

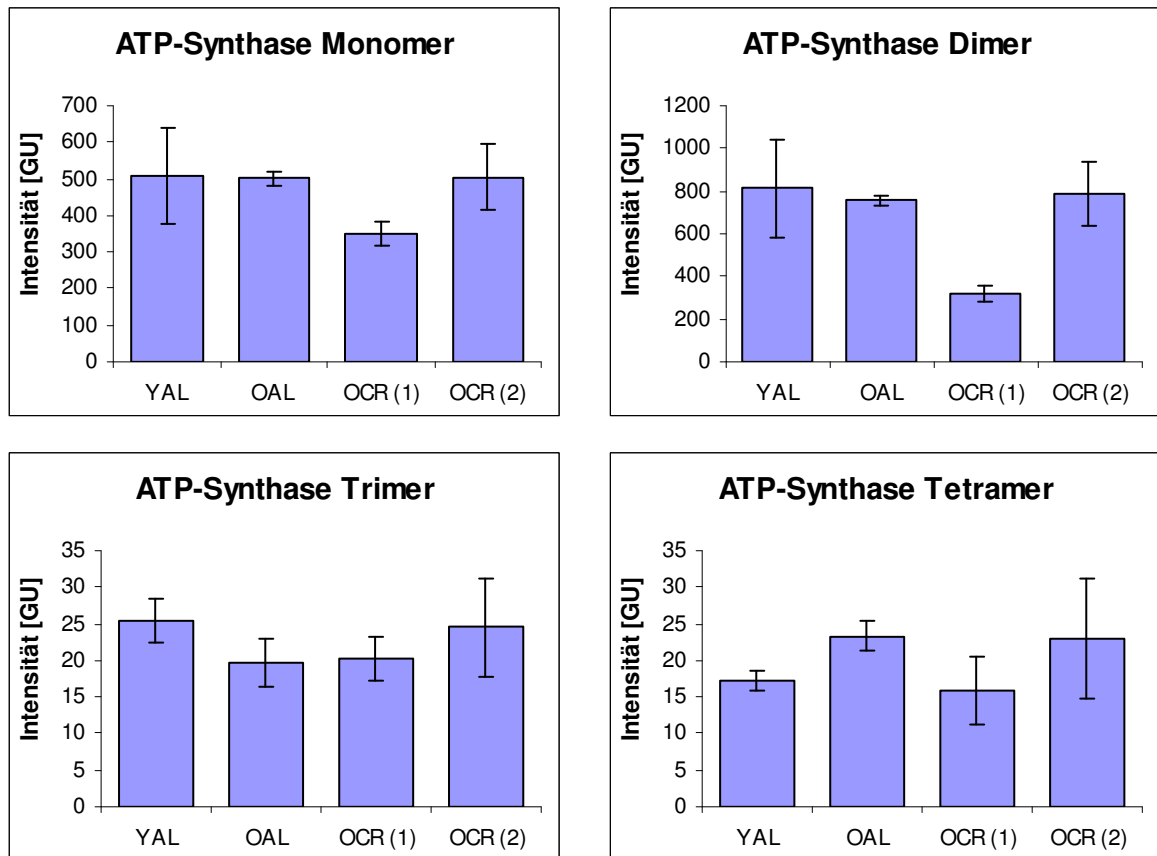
---

ungenau, da nicht nur die entsprechende Untereinheit quantifiziert wird, sondern auch der den Spot überlagernde Proteinschmier. Daher wurde auf die Quantifizierung der  $\beta$ -Untereinheit des freien  $F_1$ -Teils verzichtet. Die detektierten Untereinheiten der ATP-Synthase wurden für jede Form jeweils aufsummiert und in Abbildung 5.99 darstellt.

Es zeigt sich sowohl für das Monomer als auch für das Dimer, dass keine Änderungen der Menge der beiden ATP-Synthase-Formen mit dem Alter detektiert werden können. Für die Tiere, die im Alter einer kurzzeitigen Kalorienrestriktion unterzogen wurden, ergeben sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Phänotypen. Während die OCR (2)-Gruppe ebenfalls wie die jungen und alten *ad libitum* gefütterten Tiere Werte von ca. 500 GU für das Monomer bzw. ca. 800 GU für das Dimer zeigen, kann für die OCR (1)-Gruppe eine sehr deutliche Abnahme der ATP-Synthase-Menge detektiert werden. Für das Monomer kann mit einem Wert von 351 GU eine CR-bedingte Mengenabnahme von 30% gegenüber der OAL-Gruppe beobachtet werden, während für das Dimer der ATP-Synthase die Abnahme sogar bei 58% im Vergleich zu den alten *ad libitum* gefütterten Tieren liegt. Anhand der detektierten Intensitäten, die direkt miteinander vergleichbar sind, lässt sich erkennen, dass bei beiden Gruppen der *ad libitum* gefütterten Individuen und der OCR (1)-Gruppe mehr Dimer vorhanden ist als Monomer.

Das Trimer und das Tetramer liegen beide mit Intensitäten von maximal 25 GU in äußerst geringen Mengen vor. In niedrigen Intensitätsbereichen kommt es häufig vor, dass die Standardabweichungen sehr große Werte annehmen, da hier ein Unterschied von wenigen GU zwischen den untersuchten Gelen bereits hohe prozentuale Abweichungen bedingen, die bei einem Gesamtwert von beispielweise 500 GU so gut wie gar nicht ins Gewicht fallen. Dies ist für die Trimere und Tetramere interessanterweise so gut wie gar nicht der Fall, hier weist einzig die OCR (2)-Gruppe eine deutlich höhere Standardabweichung auf als die der anderen Gruppen. Das Trimer zeigt keine Mengenänderung zwischen der YAL-Gruppe und der OCR (2)-Gruppe, während die beiden Gruppen OAL und OCR (1) eine verminderte Trimer-Menge aufweisen. Die Abnahme mit dem Alter beträgt für die *ad libitum* gefütterten Tiere 22%. Die Kalorienrestriktion bewirkt bei der OCR (1)-Gruppe eine Mengenabnahme von 20% gegenüber den jungen Tieren. Für das Tetramer kann eine Zunahme der Menge mit dem Alter von 36% detektiert werden. Wird im Alter eine Kalorienrestriktion durchgeführt, können für die OCR (1)-Gruppe eine Mengenabnahme und für die OCR (2)-Gruppe keine Mengenänderung des Tetramers der ATP-Synthase im Vergleich zu der Gruppe der alten Individuen ohne Kalorienrestriktion detektiert werden. Die OCR (1)-Gruppe zeigt eine Verringerung der Menge von 32% gegenüber der OAL-Gruppe und gleichzeitig eine Abnahme von 8% gegenüber der Gruppe der jungen Individuen. In Absolutwerten ausgedrückt handelt es sich im Vergleich mit den jungen Tieren um eine Abnahme von nicht einmal 1,5 GU, was

aufgrund dieser geringen Intensitätsunterschiede nicht als reale Mengenänderung *in vivo* angesehen werden kann. Für alle gefunden Formen der ATP-Synthase kann eine größere Menge für die OCR (2)-Gruppe als für die OCR (1)-Gruppe detektiert werden.

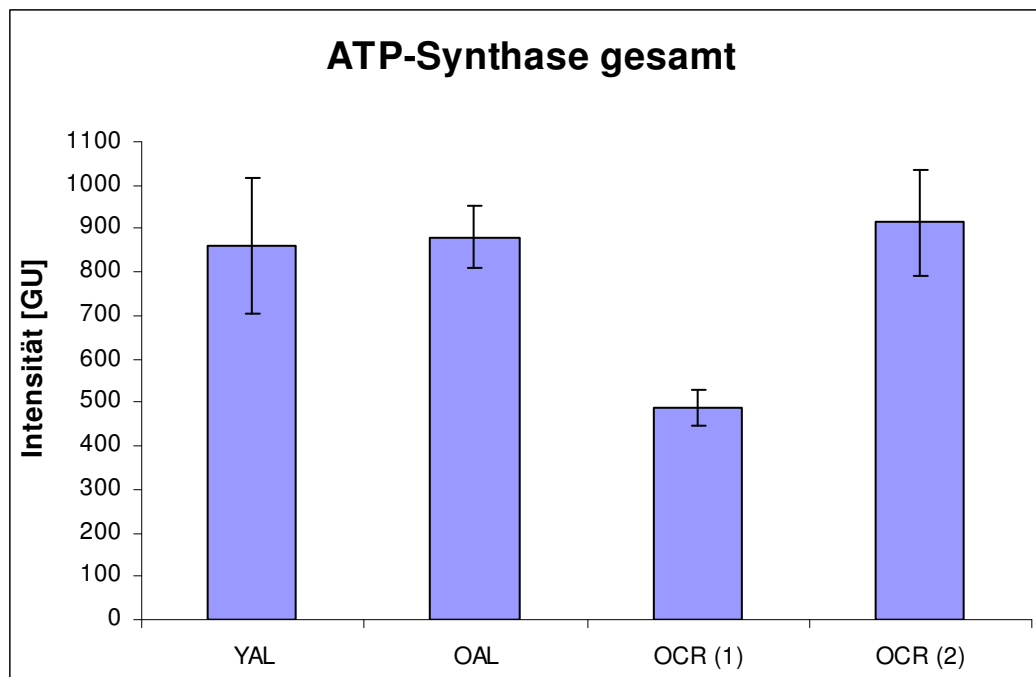


**Abb. 5.99:** Menge der in den 2D-Gelen detektierbaren Formen der ATP-Synthase aus Lebermitochondrien. Sowohl Monomer als auch Dimer zeigen keine Änderung der Menge zwischen jung und alt. Ebenfalls kann keine Änderung der Menge für die OCR (2)-Gruppe detektiert werden. Einzig die OCR (1)-Gruppe zeigt deutliche Mengenabnahmen von 30% für das Monomer und 58% für das Dimer. Trimer und Tetramer zeigen unterschiedliche Tendenzen bezüglich des Alterns. Während beim Trimer eine altersbedingte Mengeabnahme zu beobachten ist, so ist für das Tetramer eine Zunahme zu verzeichnen. Die beiden OCR-Gruppen zeigen beim Vergleich untereinander sowohl für das Trimer als auch für das Tetramer einen höheren Wert für die OCR (2)-Gruppe.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus  $n = 5$  für die YAL-Gruppe,  $n = 6$  für die OAL-Gruppe und jeweils  $n = 2$  für die OCR-Gruppen.

Bei allen ATP-Synthase-Formen können die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  in den 2D-Gelen identifiziert werden. Wird die Summe aus allen detektierten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten gebildet, erhält man die Gesamtmenge der ATP-Synthase. Diese ist in Abbildung 5.100 für alle vier Gruppen dargestellt. Es zeigt sich, dass zwischen den Gruppen YAL, OAL und OCR (2) kaum Unterschiede in der Menge festzustellen sind. Die detektierten Intensitäten liegen zwischen 859 GU für die jungen Tiere und bis zu 914 GU für die OCR (2)-Gruppe. Diese

minimalen Änderungen liegen mit maximal 6% alle unter den Werten der Standardabweichung und können aufgrund dessen nicht als reale Änderungen angesehen werden. Eine sehr deutliche Änderung ist hingegen für die OCR (1)-Gruppe zu beobachten. Hier kommt es aufgrund der Kalorienrestriktion bei zwei der vier untersuchten CR-Tiere zu einer drastischen Abnahme der ATP-Synthase-Gesamtmenge. Diese beträgt im Vergleich zur Gruppe, der jungen *ad libitum* gefütterten Tiere 42%, im Vergleich zur OAL-Gruppe sogar 45%.



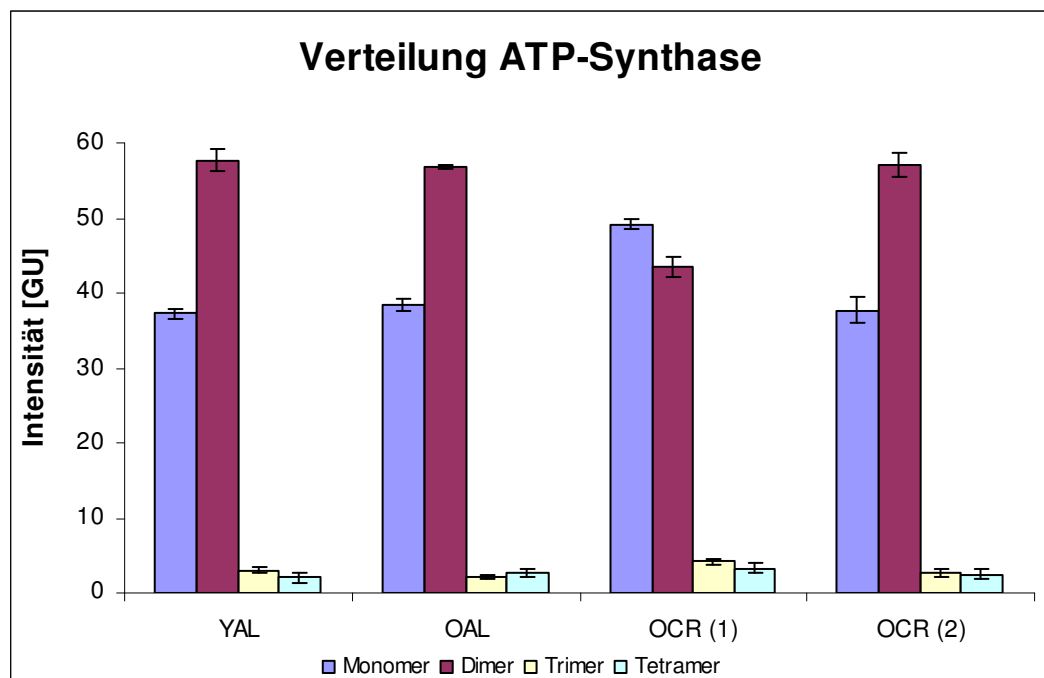
**Abb. 5.100:** Gesamtmenge der ATP-Synthase in den untersuchten Leberproben. Die Werte wurden durch Summieren der Intensitäten der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten für alle Formen ermittelt. Es zeigen sich zwischen den Gruppen YAL, OAL und OCR (2) keine Änderungen in der Gesamtmenge. Einzig die OCR (1)-Gruppe zeigt eine sehr deutliche Mengenabnahme von über 40% im Vergleich mit den anderen Gruppen.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus  $n = 5$  für die YAL-Gruppe,  $n = 6$  für die OAL-Gruppe und jeweils  $n = 2$  für die OCR-Gruppen.

Die Verteilung der Gesamtmenge der ATP-Synthase in deren detektierbare Formen ist in Abbildung 5.101 dargestellt. Es zeigen sich zwischen den Gruppen YAL, OAL und OCR (2) keine deutlichen Unterschiede. Für das Dimer können für die drei genannten Gruppen ein Anteil von 57% bis 58% ermittelt werden, was damit den größten Anteil aufweist. Das Monomer macht mit 37% bis 38% einen deutlich geringeren Anteil als das Dimer aus. Das Trimer und das Tetramer zeigen mit Abstand die geringsten Anteile von nur 2% bis 3% bei den Gruppen YAL, OAL und OCR (2). Ein deutlich davon abweichendes Bild kann allerdings für die OCR (1)-Gruppe detektiert werden. Bei der am häufigsten vorkommen Form der ATP-Synthase handelt es sich hier nicht wie bei den anderen untersuchten Gruppen um das



Dimer, sondern mit einem Anteil von 49% um das Monomer. Das Dimer erzielt nur einen Anteil von ca. 43%. Dafür kann bei den Tri- und Tetrameren der höchste Anteil mit 4% für die Trimere und 3% der Tetramere für alle untersuchten Gruppen beobachtet werden. Bisher ist noch nicht bekannt, ob die Aktivität der ATP-Synthase mit der auftretenden Form korreliert, das heißt, ob alle Formen der ATP-Synthase die gleiche Aktivität zeigen oder ob einige der gefundenen Formen weniger aktive Varianten der ATP-Synthase darstellen. Allerdings lässt sich nur mithilfe dieses Wissens eine solch drastisch veränderte Verteilung der ATP-Synthase auf die gefundenen Formen interpretieren.

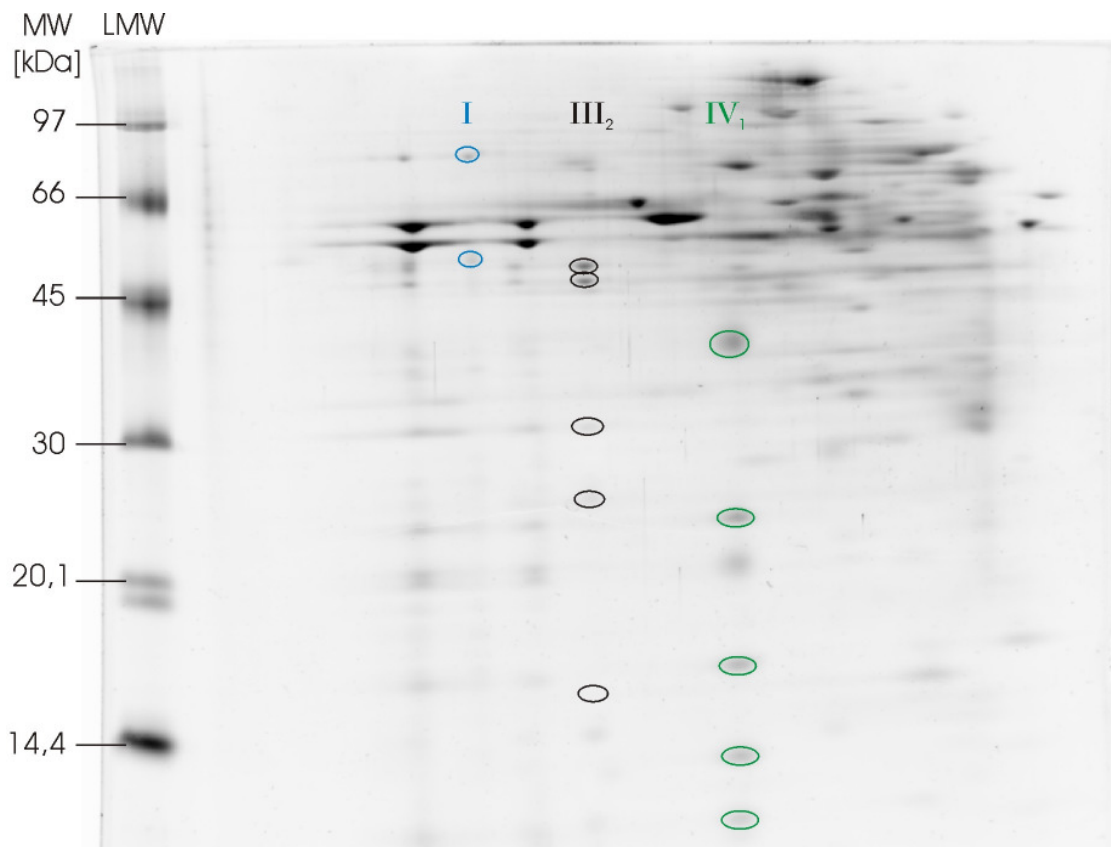


**Abb. 5.101:** Anteil an der Gesamtmenge der ATP-Synthase der gefundenen ATP-Synthase-Formen in den untersuchten Leberproben. Es zeigen sich zwischen den Gruppen YAL, OAL und OCR (2) keine Änderungen in der Verteilung auf die ATP-Synthase-Formen Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer. Bei diesen Gruppen macht das Dimer den größten Teil aus, gefolgt vom Monomer. Tri- und Tetramer sind beide nur in sehr geringen Mengen von 2% bis 3% vorhanden. Einzig die OCR (1)-Gruppe zeigt eine sehr deutliche Abweichung von der Verteilung im Vergleich zu den anderen Gruppen. Hier kann für das Monomer der höchste Anteil detektiert werden, dicht gefolgt vom Dimer. Der Anteil der Tri- und Tetramere liegt um ca. 1 Prozentpunkt höher als bei den anderen Gruppen.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus  $n = 5$  für die YAL-Gruppe,  $n = 6$  für die OAL-Gruppe und jeweils  $n = 2$  für die OCR-Gruppen.

#### 5.5.4.2 Individuelle Komplexe

In nativen Gelen und daraus entstandenen 2D-Gelen, in denen mitochondriale (Membran-) Proteine aufgetrennt sind, können die Komplexe I, III<sub>2</sub> und IV sowohl einzeln als individueller Komplex als auch mit anderen Atmungskettenkomplexen zu Superkomplexen assoziiert vorliegen. Komplex II hingegen konnte wie die ATP-Synthase bisher nicht als Teil eines Superkomplexes in Säugerzellen nachgewiesen werden und liegt daher stets als individueller Komplex vor. In den hier untersuchten Mitochondrien aus Rattenleber können die individuellen Komplexe I, III<sub>2</sub> und IV detektiert werden. Die Lage der identifizierten Untereinheiten für die verschiedenen Komplexe ist in Abbildung 5.102 dargestellt.

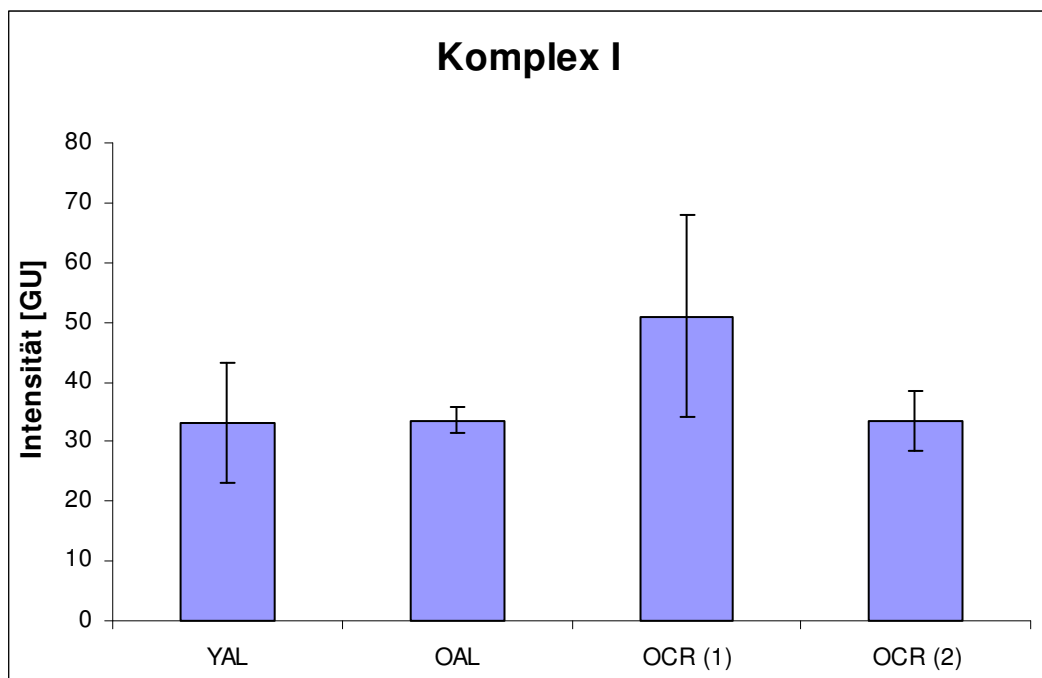


**Abb. 5.102:** Ausschnitt eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby gefärbten 2D-Gels (OAL-Gruppe) der untersuchten Mitochondrien aus Rattenleber. Die markierten Proteinspots zeigen die quantifizierten Untereinheiten der individuellen Komplexe I (blau), III<sub>2</sub> (schwarz) und IV<sub>1</sub> (grün) der Atmungskette.

Von Komplex I können zwei Untereinheiten detektiert werden. Dabei handelt es sich um das Fe-S-Protein und das Flavo-Protein. Diese beiden Untereinheiten werden für den Mengenvergleich des individuellen Komplexes für die untersuchten Gruppen aufaddiert und in Abbildung 5.103 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die gemessenen Intensitäten für die Summe der beiden Untereinheiten mit 33 bis 51 GU für alle Gruppen sehr niedrig sind. Des



Weiteren ist deutlich erkennbar, dass die Gruppen YAL, OAL und OCR (2) keine Unterschiede in der detektierbaren Menge an individuellem Komplex I aufweisen. Für diese drei Gruppen konnte der selbe Wert von 33 GU detektiert werden. Einzig die OCR (1)-Gruppe zeigt mit einem Wert von 51 GU eine abweichende Menge an individuellem Komplex I. Bei dieser Gruppe kommt es durch die applizierte Kalorienrestriktion im Alter zu einer deutlichen Mengenzunahme von 55% im Vergleich zu den anderen drei Gruppen, jedoch kann für die OCR (1)-Gruppe eine sehr hohe Standardabweichung von ca. 33% des detektierten Intensitätswertes beobachtet werden.

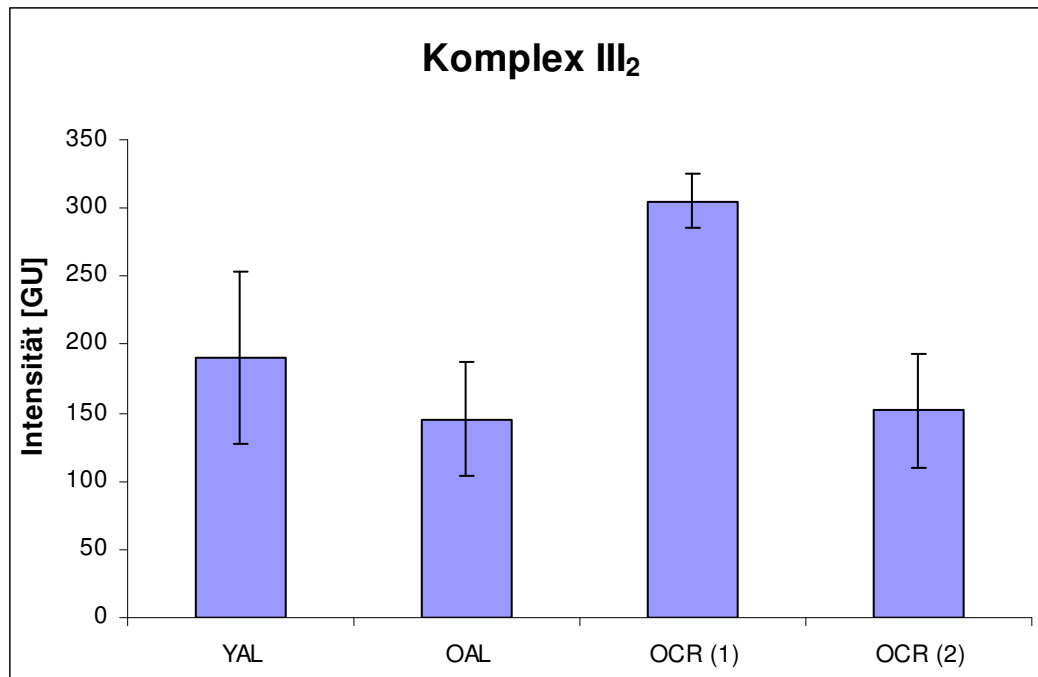


**Abb. 5.103:** Menge an individuellem Komplex I in den untersuchten Mitochondrien aus Rattenleber. Es zeigt sich zwischen den Gruppen YAL, OAL und OCR (2) keine Mengenänderung, weder mit dem Alter noch mit Kalorienrestriktion. Einzig die OCR (1)-Gruppe zeigt eine um 55% erhöhte Menge im Vergleich zu den anderen drei Gruppen.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus  $n = 5$  für die YAL-Gruppe,  $n = 6$  für die OAL-Gruppe und jeweils  $n = 2$  für die OCR-Gruppen.

In den untersuchten 2D-Gelen können fünf Untereinheiten für Komplex III<sub>2</sub> quantifiziert werden. Dabei handelt es sich mit abnehmender Masse um die Untereinheiten Core I und Core II, Cytochrom c, die Rieske-Eisen-Schwefel-Untereinheit und das Bindeprotein. Für den Mengenvergleich wurden die detektierten Mengen der einzelnen Untereinheiten addiert und als Summe in Abbildung 5.104 miteinander verglichen. Die Menge von Komplex III<sub>2</sub> zeigt eine altersbedingte Mengenabnahme von 24%. Die erste Gruppe der Tiere mit Kalorienrestriktion zeigt eine höhere Intensität als die normal gealterten Tiere ohne

Kalorienrestriktion. Im Vergleich mit der OAL-Gruppe kann für die OCR (1)-Gruppe ein sehr deutlicher Anstieg der Komplex III<sub>2</sub>-Menge von 109% beobachtet werden. Im Gegensatz dazu kann für die OCR (2)-Gruppe im Vergleich mit der OAL-Gruppe nur eine Intensitätserhöhung von 6 GU und damit eine Mengenzunahme von 4% detektiert werden. Diese Änderung ist so minimal, dass von einer unveränderten Proteinmenge von Komplex III<sub>2</sub> *in vivo* ausgegangen werden muss.

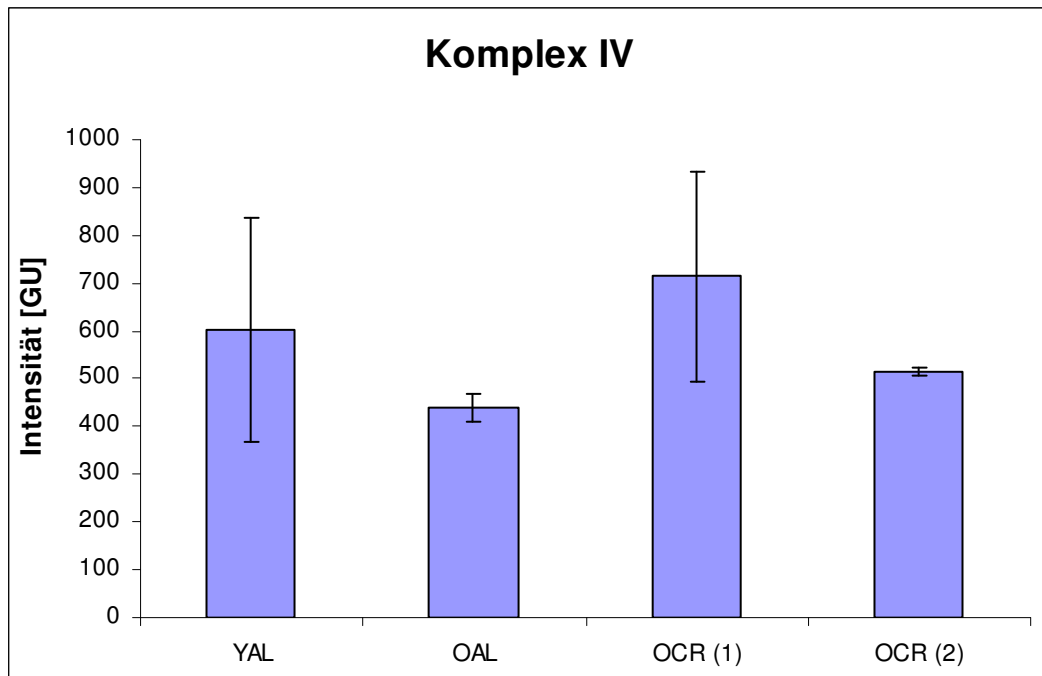


**Abb. 5.104:** Menge an individuellem Komplex III<sub>2</sub> in den untersuchten Mitochondrien aus Rattenleber. Es zeigt sich eine altersbedingte Mengenabnahme von 24%, während die Kalorienrestriktion im Vergleich mit den alten *ad libitum* gefütterten Tieren eine deutliche Mengenzunahme für die OCR (1)-Gruppe bzw. keine Mengenänderung für die OCR (2)-Gruppe bewirkt.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus n = 5 für die YAL-Gruppe, n = 6 für die OAL-Gruppe und jeweils n = 2 für die OCR-Gruppen.

Für individuellen Komplex IV können fünf Untereinheiten detektiert werden. Dabei handelt es sich um die Untereinheiten COX 1, II, IV, Va und VIa. Deren Summe in den jeweiligen Gruppen ist in Abbildung 5.105 dargestellt. Es zeigt sich eine altersbedingte Mengenabnahme für Komplex IV von 27%. Werden die Tiere im Alter einer Kalorienrestriktion unterzogen, können zwei unterschiedliche Effekte beobachtet werden. Die OCR (1)-Gruppe zeigt im Vergleich mit den jungen Tieren eine Erhöhung von 18% und im Vergleich mit den alten Tieren sogar eine Erhöhung um 62%. Im Gegensatz dazu kann für die zweite OCR-Gruppe eine geringfügige Abnahme gegenüber den jungen Tieren von 14% und eine Zunahme der Proteinmenge von 17% detektiert werden. Damit lassen sich ebenso wie

bereits für die individuellen Komplexe I und III<sub>2</sub> gezeigt sehr große Mengenunterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen der alten Tiere mit applizierter Kalorienrestriktion beobachten.

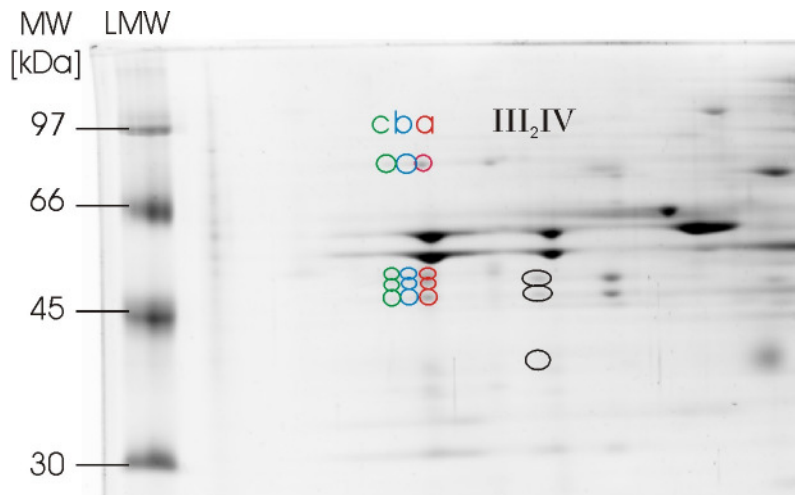


**Abb. 5.105:** Menge an individuellem Komplex IV in den untersuchten Mitochondrien aus Rattenleber. Es zeigt sich eine altersbedingte Mengenabnahme von 27%, während die Kalorienrestriktion im Vergleich mit den alten *ad libitum* gefütterten Tieren eine deutliche Mengenzunahme von 62% für die OCR (1)-Gruppe bzw. eine nur leichte Zunahme von 17% für die OCR (2)-Gruppe bewirkt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus n = 5 für die YAL-Gruppe, n = 6 für die OAL-Gruppe und jeweils n = 2 für die OCR-Gruppen.

#### 5.5.4.3 Superkomplexe

In den in dieser Arbeit untersuchten Mitochondrien aus Rattenleber können verschiedene Superkomplexe in den 2D-Gelen gefunden werden. Dabei handelt es sich um den kleinsten in Säugerzellen nachgewiesenen Superkomplex III<sub>2</sub>IV mit einer Masse von ca. 700 kDa und die Superkomplexe I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>0-2</sub>, auch Superkomplex a bis c genannt mit steigender molekularer Masse von 1500 kDa bis 1900 kDa. Für Superkomplex III<sub>2</sub>IV können drei Untereinheiten detektiert werden. Dabei handelt es sich um die beiden Komplex III-Untereinheiten Core I und II und die größte Untereinheit von Komplex IV, COX 1. Für die drei Superkomplexe a bis c können neben den beiden größten Untereinheiten von Komplex I, das Fe-S-Protein und das Flavoprotein, ebenfalls Core I und II von Komplex III gefunden und quantifiziert werden. Für die in diesem Kapitel dargestellten Diagramme werden diese quantifizierten Mengen der

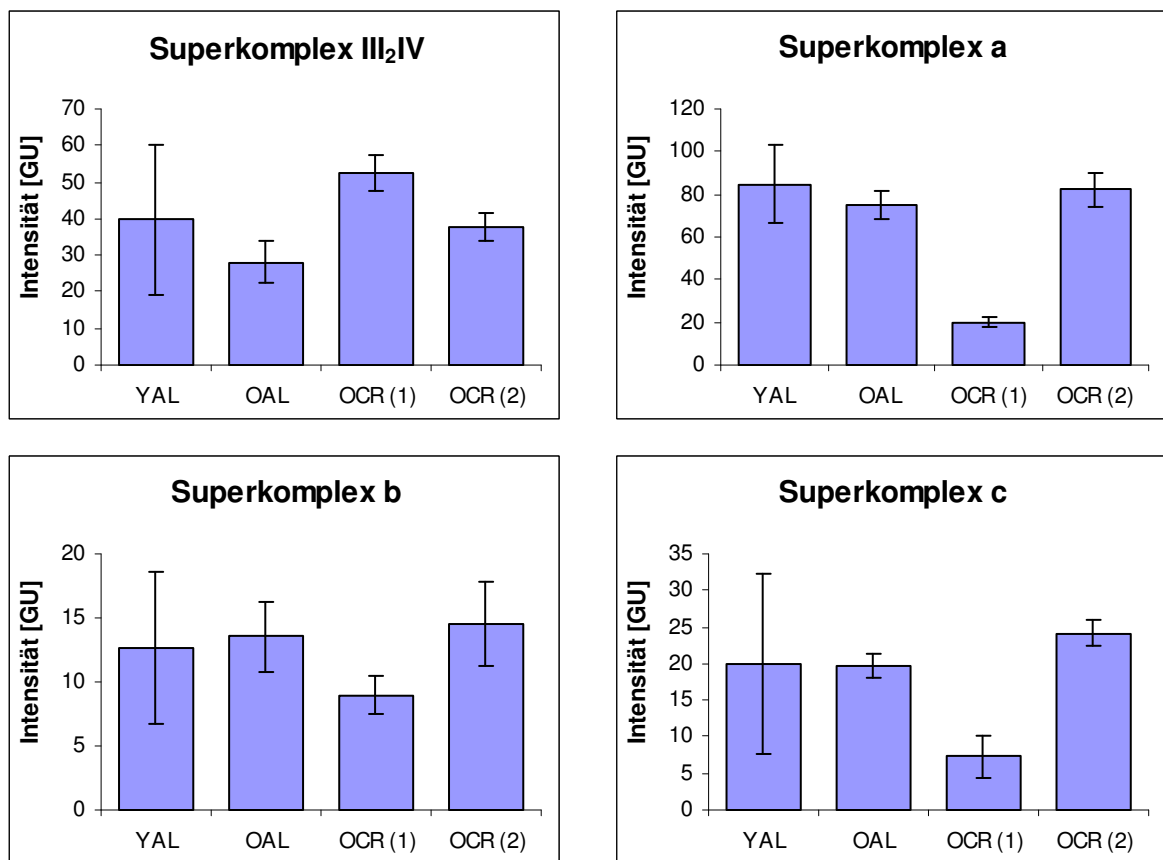
Untereinheiten zu einem Gesamtwert aufsummiert. Die Lage der detektierten Untereinheiten der Superkomplexe in den untersuchten 2D-Gelen der Lebermitochondrien ist in Abbildung 5.106 dargestellt.



**Abb. 5.106:** Ausschnitt eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby gefärbten 2D-Gels (OAL-Gruppe) der untersuchten Mitochondrien aus Rattenleber. Die markierten Proteinspots zeigen die quantifizierten Untereinheiten der Superkomplexe III<sub>2</sub>IV (schwarz), a (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>, rot), b (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>, blau) und c (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>, grün) der Atmungskette.

Die Mengen der detektierbaren Superkomplexe sind in Abbildung 5.107 aufgeführt. Besonders auffällig ist hierbei die nahezu konstante Menge in den Proben der Gruppen YAL, OAL und der zweiten OCR-Gruppe für die Superkomplexe a bis c. Die vorhandenen detektierten Mengenänderungen liegen größtenteils in Bereichen von bis zu 10%, während die maximale Veränderung in der Proteinmenge bei 23% liegt (OCR (2)-Gruppe zu OAL bei Superkomplex c). Die Proteinmengen der ersten OCR-Gruppe zeigen hingegen bei diesen Superkomplexen teilweise sehr starke Abnahmen im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen. Diese liegen beim Vergleich der OCR (1)-Gruppe mit der Gruppe der normal gealterten Tiere für Superkomplex a bei sehr deutlichen 73%, bei den beiden Komplex IV-enthaltenden Superkomplexen b und c betragen diese 34% bzw. ebenfalls sehr deutliche 63%. Einzig für den kleinsten detektierbaren Superkomplex III<sub>2</sub>IV kann eine andere Tendenz beobachtet werden. Hier kann eine altersbedingte Abnahme der Proteinmenge von 29% detektiert werden. Im Gegensatz zu den anderen quantifizierten Superkomplexen zeigt hier die Gruppe OCR (1) die größte Proteinmenge für den kleinen Superkomplex von allen vier untersuchten Gruppen. Diese liegt mit einer Zunahme von 86% fast bei dem doppelten Wert der Vergleichsgruppe der alten Ratten, die *ad libitum* gefüttert wurden. Im Vergleich zu den jungen Tieren ist ebenfalls eine Mengenzunahme zu verzeichnen, diese beträgt allerdings mit 32% deutlich weniger als der Vergleich mit der OAL-Gruppe.

Insgesamt liegen die detektierten Proteinmengen der verschiedenen Superkomplexe in einem Bereich von durchschnittlich etwa 20 bis ca. 80 GU, die OCR (1)-Gruppe ist jedoch davon ausgenommen, da hier sehr starke Abweichungen zu den anderen Gruppen zu beobachten sind. Dabei zeigt sich, dass Superkomplex a den mengenmäßig am häufigsten in den untersuchten 2D-Gelen vorkommenden Superkomplex darstellt. So kann von Superkomplex c nur ca. ein Viertel und von Superkomplex b sogar nur knapp ein Fünftel der Menge von Superkomplex a detektiert werden. Superkomplex III<sub>2</sub>IV stellt den zweithäufigsten Superkomplex mit etwa der Hälfte der detektierbaren Menge von Superkomplex a dar.



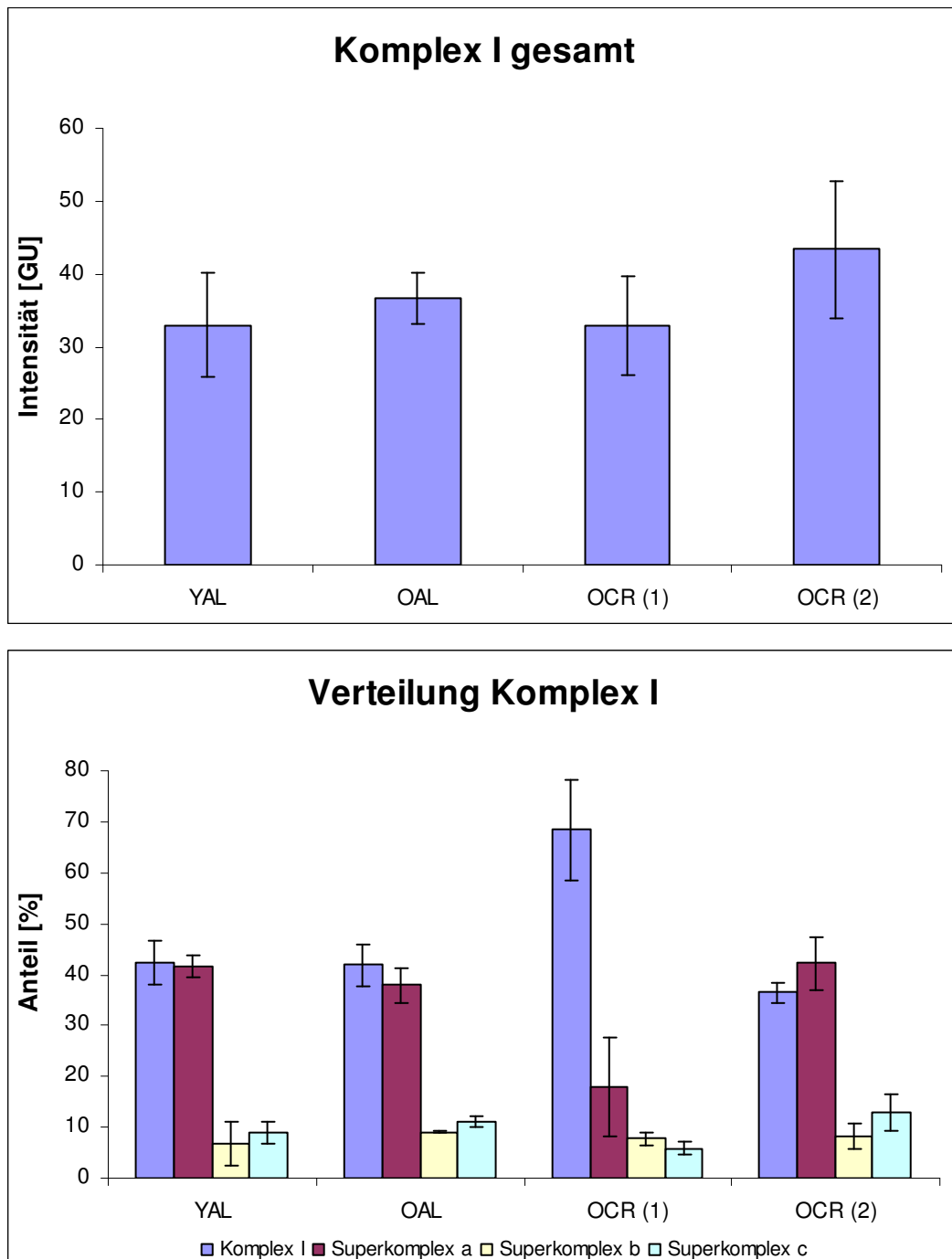
**Abb. 5.107:** Menge an detektierbaren Superkomplexen in den untersuchten Mitochondrien aus Rattenleber. Es zeigt sich, dass für die Superkomplexe a bis c zwischen den Gruppen YAL, OAL und OCR (2) nur wenige Veränderungen detektiert werden können. Einzig OCR (1) zeigt einen deutlichen Unterschied zu den anderen drei Gruppen. Hier kommt es bei allen drei Superkomplexen zu deutlichen Mengenabnahmen von bis zu 73%. Im Gegensatz dazu kann für Superkomplex III<sub>2</sub>IV für OCR (1) die höchste Proteinmenge detektiert werden, die mit einem Wert von 52 GU nahezu doppelt so hoch ist wie die vergleichbare Gruppe der alten *ad libitum* gefütterten Tiere mit einer Intensität von nur 28 GU.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus n = 5 für die YAL-Gruppe, n = 6 für die OAL-Gruppe und jeweils n = 2 für die OCR-Gruppen.

---

Komplex I ist neben seinem Vorkommen als individueller Atmungskettenkomplex Bestandteil vieler Superkomplexe. So kann die Fe-S-Untereinheit von Komplex I in den hier untersuchten Lebermitochondrien sowohl im individuellen Komplex als auch als Teil der Superkomplexe a bis c detektiert werden. Diese Untereinheit liegt auf den 2D-Gelen sehr isoliert von anderen Untereinheiten und kann daher problemlos quantifiziert werden. Summiert man die Mengen der Fe-S-Untereinheit aus dem individuellen Komplex und den Superkomplexen, erhält man die Gesamtmenge dieser Untereinheit. Da sich die Stöchiometrie in Abhängigkeit des Vorliegens von Komplex I als individueller Komplex oder Teil eines Superkomplexes nicht ändert, kann diese Untereinheit stellvertretend für die Gesamtmenge an vollständigem Komplex I herangezogen werden. Neben der Gesamtmenge von Komplex I ist ebenso die Verteilung auf die individuelle Form und die Superkomplexe a bis c von Interesse, da eine unveränderte Menge nicht zwangsläufig eine unveränderte Verteilung nach sich zieht. Sowohl die Gesamtmenge von Komplex I als auch dessen Verteilung sind in Abbildung 5.108 dargestellt.

Die Gesamtmenge von Komplex I zeigt zwischen den Gruppen YAL, OAL und OCR (1) nur wenige Veränderungen. Während YAL und OCR (1) mit jeweils 33 GU den gleichen Wert aufweisen, kann eine geringe altersbedingte Zunahme der Gesamtmenge von Komplex I von 11% beim Vergleich der jungen und der alten *ad libitum* gefütterten Tiere detektiert werden. Die größte Veränderung zeigt die zweite Gruppe der alten Tiere mit Kalorienrestriktion. Hier ist eine deutliche Mengenzunahme von 32% bzw. 19% im Vergleich zu den jungen bzw. zu den alten Tieren zu beobachten. Die Verteilung von Komplex I auf seine individuelle Form und die Komplex I-enthaltenden Superkomplexe a bis c zeigt eine deutliche Veränderung der Anteile der ersten OCR-Gruppe im Vergleich zu den anderen drei Gruppen. Obwohl die Gruppen YAL, OAL und OCR (2) Unterschiede in der Gesamtmenge aufweisen, zeigt die Verteilung dieser Menge auf die verschiedenen Formen, in der Komplex I vorliegen kann, nur sehr wenige Änderungen. Es können für diese nur leicht schwankende Anteile von um die 40% sowohl für den individuellen Komplex als auch für den kleinsten Komplex I-enthaltenden Superkomplex a detektiert werden, während OCR (1) einen Anteil von 68% allein für den individuellen Komplex I aufweist. Diese sehr deutliche Erhöhung des Anteils an der Gesamtmenge ist hauptsächlich durch die geringen Mengen und die daraus resultierenden geringen Anteile von Superkomplex a und Superkomplex c bedingt (siehe auch Abb. 5.107), die nur noch Anteile von 18% bzw. 6% aufweisen. Demnach scheint es bei der ersten OCR-Gruppe zu einem Zerfall der hochmolekularen Superkomplex-Strukturen in deren Einzelkomplexe zu kommen. Der Vergleich der *ad libitum* gefütterten Tiere zeigt, dass sich der Anteil des individuellen Komplexes nicht ändert, jedoch die Verteilung auf die Superkomplexe a bis c um bis zu 4 Prozentpunkte variiert.



**Abb. 5.108:** Menge (oben) und Verteilung (unten) der Fe-S-Untereinheit von Komplex I in den untersuchten Mitochondrien aus Rattenleber. Es zeigen sich zwischen den Gruppen YAL, OAL und OCR (1) nur geringe Mengenunterschiede von Komplex I, während die OCR (2)-Gruppe eine Zunahme der Menge von 32% im Vergleich zu YAL und 19% im Vergleich zu OAL aufweist. Die Verteilung von Komplex I auf die gefundenen Formen zeigt jedoch, dass für OCR (1) stark abweichende Anteile von individuellem Komplex I und Superkomplex a detektierbar sind. Während bei den Gruppen YAL, OAL und OCR (2) individueller Komplex I und Superkomplex a jeweils einen Anteil von etwa 40% ausmachen, kann bei OCR (1) eine sehr deutliche Verschiebung des Anteils zugunsten des Monomers beobachtet werden, das einen Anteil von 68% der Gesamtmenge einnimmt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus  $n = 5$  für die YAL-Gruppe,  $n = 6$  für die OAL-Gruppe und jeweils  $n = 2$  für die OCR-Gruppen.

---

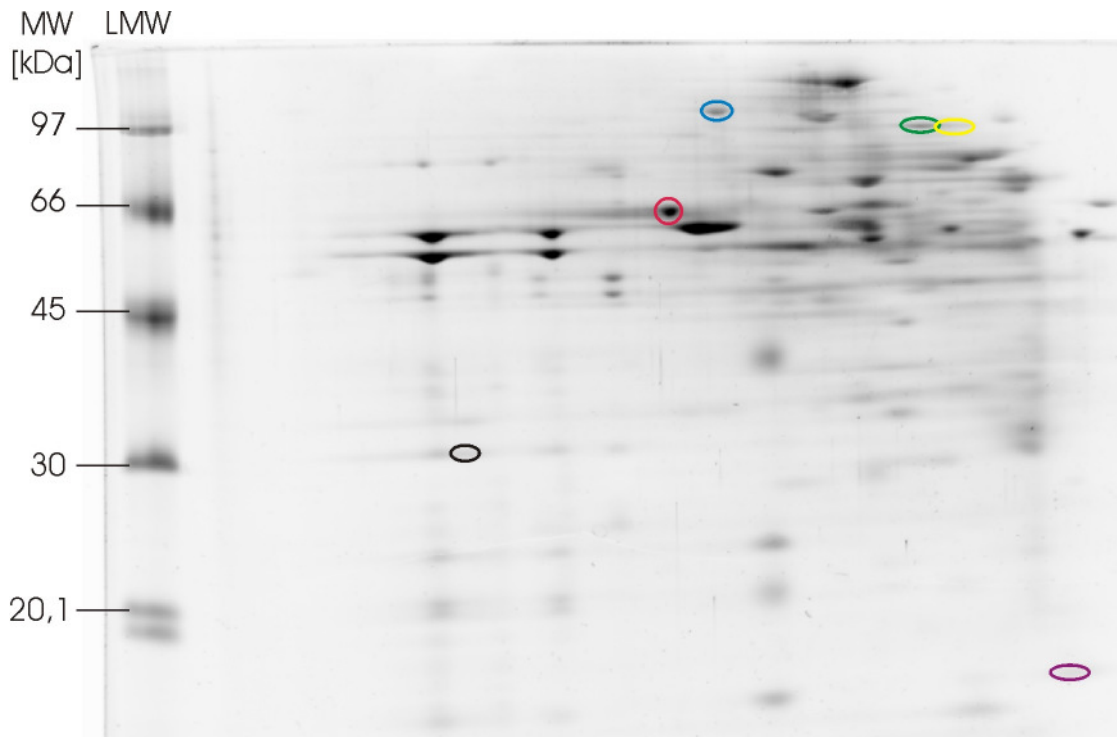
#### 5.5.4.4 Nicht-OxPhos-Proteine

Neben den Komplexen und Superkomplexen der oxidativen Phosphorylierung können in den 2D-Gelen der Mitochondrien aus Rattenleber andere mitochondriale Proteine identifiziert werden, die nicht aktiv an der Zellatmung beteiligt sind.. Es handelt sich dabei um die Proteine Prohibitin, HSP60 und Cytochrom  $b_5$  sowie die Enzyme Aconitase, Nikotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase und Dimethylglycin-Dehydrogenase.

Prohibitin ist ein membranständiges Chaperon, das in der inneren Mitochondrienmembran vorliegt und dort vermutlich die Faltung in die richtige Konformation der Atmungskettenkomplexe katalysiert. Es gibt zwei Isoformen von Prohibitin, die sich vornehmlich durch ihre Masse von knapp 30 kDa bei Typ I und knapp 33 kDa bei Typ II unterscheiden und sich alternierend zu Ringstrukturen mit je etwa 16 bis 20 Monomeren der beiden Isoformen mit einer Gesamtmasse von 1,0 bis 1,4 MDa zusammenlagern<sup>[169]</sup>. HSP60 ist ebenso wie das Prohibitin ein Chaperon, das bei der korrekten Faltung von Proteinen eine wichtige Rolle spielt. Im Gegensatz zum Prohibitin ist das HSP60 allerdings ein lösliches Protein, das in der Matrix lokalisiert ist. Dort bildet es eine heptamere Struktur mit einer Masse von 420 kDa aus und ist am Transport von ungefalteten Proteinen durch die innere Mitochondrienmembran und der sich daran anschließenden korrekten Faltung des Proteins beteiligt. Cytochrom  $b_5$  hingegen ist in der äußeren Mitochondrienmembran und in Mikrosomenmembranen lokalisiert und fungiert mithilfe der an das Protein gebundenen Hämgruppe als Elektronencarrier. Die Aconitase ist ein Enzym des Citratcyclus und somit in der mitochondrialen Matrix zu finden. Es katalysiert die Reaktion von Citrat zu Isocitrat und legt damit den Grundstein für die im Citratcyclus stattfindende Herstellung von Reduktionsäquivalenten für die oxidative Phosphorylierung. Durch die membranständige Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase wird in der inneren Mitochondrienmembran die reversible Übertragung eines Hydridions zwischen NADH und NADP katalysiert. Dabei kommt es zu einer Protonentranslokation aus der Matrix in den Intermembranraum, was zur Erhaltung des elektrochemischen Protonengradienten beiträgt. Die Dimethylglycin-Dehydrogenase ist ein lösliches monomeres Protein in der mitochondrialen Matrix mit einer Masse von ca. 96 kDa und ist involviert in den Glycin-Metabolismus der Zelle. Es katalysiert innerhalb der Reaktionskette von Cholin zu Glycin mit Hilfe des an das Protein gebundenen Co-Faktors FADH die Reaktion von Dimethylglycin und Wasser zu Sarcosin und Formaldehyd.

Die hier beschriebenen quantifizierten Proteine und deren Lage in den 2D-Gelen sind in Abbildung 5.109 dargestellt.



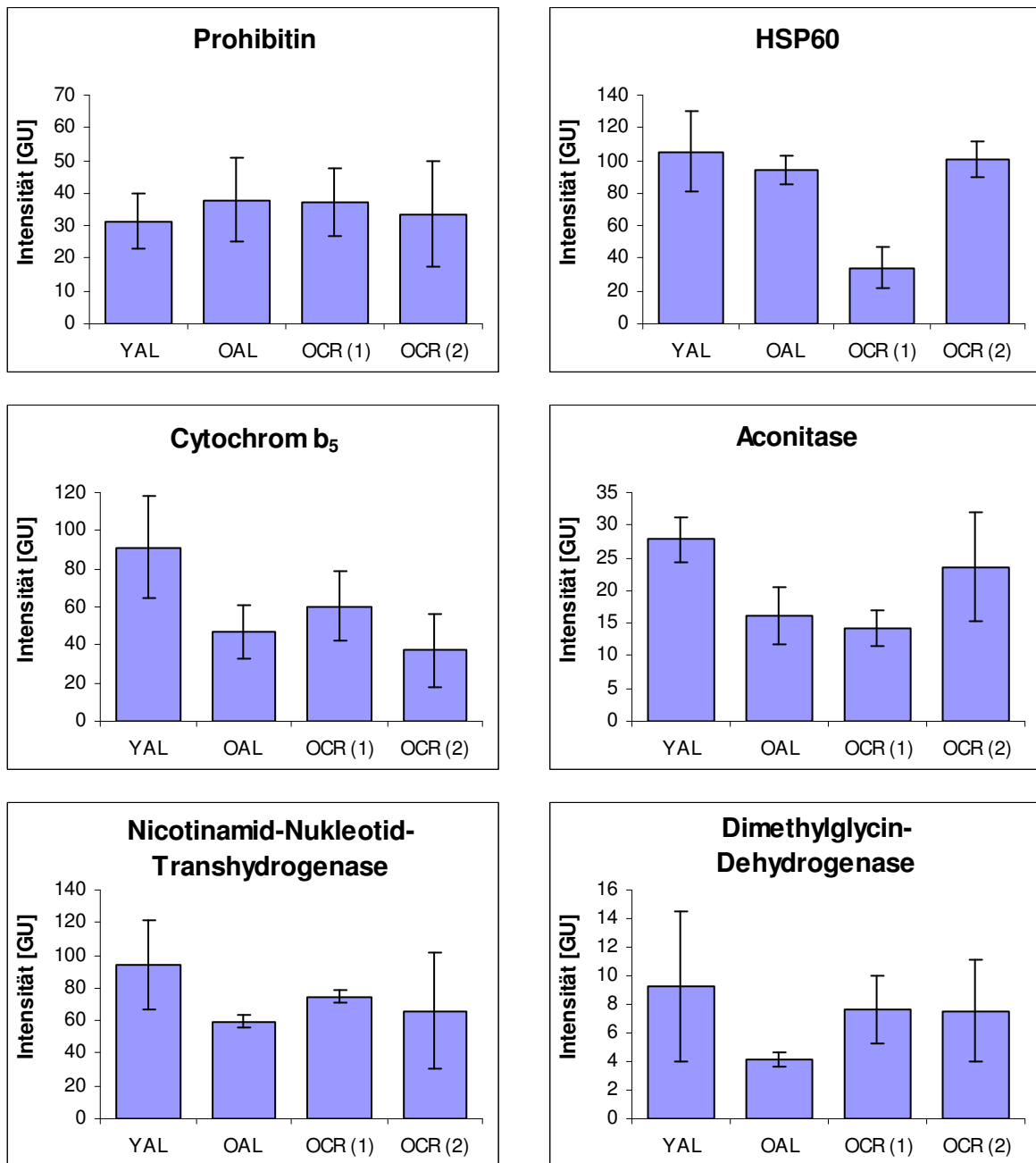


**Abb. 5.109:** Ausschnitt eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby gefärbten 2D-Gels (OAL-Gruppe) der untersuchten Mitochondrien aus Rattenleber. Die markierten Proteinspots zeigen die quantifizierten mitochondrialen Proteine, die nicht Teil der oxidativen Phosphorylierung sind. Dabei handelt es sich um Prohibitin (schwarz), HSP60 (rot), Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase (blau), Dimethylglycin-Dehydrogenase (grün), Aconitase (gelb) und Cytochrom b<sub>5</sub> (violett).

Die quantifizierten Mengen der sechs mitochondrialen Proteine, die keinen Teil der Atmungskette darstellen, sind in Abbildung 5.110 gezeigt. Es ist auffällig, dass bei fünf der sechs untersuchten Proteine jeweils die YAL-Gruppe die höchste Proteinmenge der vier Gruppen aufweist. Einzig für Prohibitin kann dies nicht detektiert werden, hier verhält sich die YAL-Gruppe gegensätzlich zu den anderen Proteinen und weist die geringste Proteinmenge auf. Prohibitin zeigt zwischen den verschiedenen Gruppen nur sehr wenige Mengenänderungen. Alle detektierten Intensitäten liegen zwischen 31 und 38 GU und damit bei maximalen Unterschieden von 21% (Zunahme von OAL im Vergleich zu YAL). Aufgrund der Standardabweichungen, die bei allen Gruppen einen höheren Wert als die detektierbaren Änderungen der Prohibitin-Menge aufweisen, ist nicht nachweisbar, inwiefern die hier beobachteten Veränderungen der Proteinmenge der *in vivo* vorliegenden Situation entsprechen. Im Gegensatz zu Prohibitin kann für das Chaperon HSP60 zumindest für eine der vier untersuchten Gruppen eine sehr deutliche Veränderung detektiert werden. Während die Gruppen YAL, OAL und OCR (2) mit Werten zwischen 94 und 105 GU nur minimale Unterschiede zeigen, kann für die erste OCR-Gruppe eine sehr starke Mengenabnahme beobachtet werden. Diese Gruppe weist nur einen Wert von 34 GU auf, was einer Abnahme von 68% im Vergleich zur Gruppe der jungen Tiere und 64% im Vergleich mit der Gruppe der

---

alten Tiere, die *ad libitum* gefüttert wurden. Das Cytochrom  $b_5$  zeigt für alle drei untersuchten Gruppen der alten Tiere Mengenabnahmen im Vergleich zur Gruppe der jungen Tiere. Diese altersbedingten Abnahmen liegen bei 49% für die OAL-Gruppe, bei 34% für die erste OCR-Gruppe und bei der zweiten OCR-Gruppe bei sehr deutlichen 59%. Daraus ergibt sich für den Effekt der Kalorienrestriktion sowohl eine Erhöhung der Menge von Cytochrom  $b_5$  für OCR (1) von 29% als auch eine Mengenabnahme von 20% für die zweite Gruppe, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, im Vergleich zur OAL-Gruppe. Für die Aconitase kann ebenfalls, wie bereits für das Cytochrom  $b_5$  beobachtet, eine altersbedingte Mengenabnahme für alle drei Gruppen der gealterten Individuen detektiert werden. Beim Altern der Tiere, die *ad libitum* gefüttert wurden, kommt es zu einer Erniedrigung der Proteinmenge um 42%. Die beiden OCR-Gruppen zeigen ebenfalls niedrigere Werte als die YAL-Gruppe, allerdings kommt es hier im Vergleich zur OAL-Gruppe sowohl zu einer sehr leichten Abnahme von OCR (1) um 11% und zu einer Zunahme von OCR (2) um 47%. Damit zeigt die zweite OCR-Gruppe von den drei untersuchten Gruppen alter Ratten mit nur 15% die geringste Abnahme gegenüber den jungen Tieren. Die Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase zeigt die höchste Proteinmenge bei der Gruppe der jungen Tiere. Für alle Gruppen der alten Tiere kann, unabhängig davon, ob die Tiere *ad libitum* gefüttert wurden oder einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, eine Mengenabnahme im Vergleich zu den jungen Individuen detektiert werden. Es kann für das Altern eine Mengenabnahme von 37% beobachtet werden. Die alten Tiere zeigen im Vergleich untereinander mit Werten zwischen 60 und 75 GU nur sehr moderate Veränderungen der Proteinmenge. Daraus ergeben sich für die beiden OCR-Gruppen leichte Mengenzunahmen infolge der applizierten Kalorienrestriktion von 26% für OCR (1) und 11% für OCR (2) im Vergleich zu den alten Tieren, die *ad libitum* gefüttert wurden. Auffallend sind die hohen Standardabweichungen bei der YAL- und der OCR (2)-Gruppe, während die OAL- und die OCR (1)-Gruppe mit einer Standardabweichung von nur knapp 4 GU äußerst geringe Fehlerbalken aufweisen. Bei der Dimethylglycin-Dehydrogenase sind die detektierten Intensitäten mit Werten zwischen 4 und 9 GU äußerst gering. Solche niedrigen Intensitätswerte bedingen sehr häufig sehr hohe Standardabweichungen, die sich auch in diesem Fall zumindest für die Gruppen YAL, OCR (1) und OCR (2) zeigen. Einzig die OAL-Gruppe weist trotz der sehr geringen detektierten Intensität von nur 4 GU eine äußerst geringe Standardabweichung auf. Für alle Gruppen der alten Tiere können altersbedingte Mengenabnahmen von 55%, 17% und 19% detektiert werden, wobei wiederum beide OCR-Gruppen im Vergleich mit der OAL-Gruppe eine CR-bedingte Zunahme der Enzymmenge von 86% bzw. 82% zeigen. Aufgrund der hohen Standardabweichungen der beiden OCR-Gruppen und der YAL-Gruppe kann keine Aussage getroffen werden, ob die detektierten Änderungen *in vivo* tatsächlich vorzufinden sind.



**Abb. 5.110:** Menge der detektierten mitochondrialen Proteine aus Lebermitochondrien, die nicht in die oxidative Phosphorylierung involviert sind. Es zeigt sich, dass bei fünf der sechs untersuchten Proteine die YAL-Gruppe die jeweils größte Proteinmenge aufweist. Bei Prohibitin sind nur geringe Mengenänderungen detektierbar, sodass hier von einer nahezu konstanten Menge des Proteins *in vivo* ausgegangen werden kann. Für das HSP60 kann nur für die OCR (1)-Gruppe eine deutliche Mengenabnahme detektiert werden. Sowohl das Cytochrom b<sub>5</sub> als auch die Enzyme Aconitase, Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase und Dimethylglycin-Dehydrogenase zeigen deutliche altersbedingte Abnahmen von bis zu 55%.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts der technischen Replikate. Der Probenpool der Gruppen besteht aus n = 5 für die YAL-Gruppe, n = 6 für die OAL-Gruppe und jeweils n = 2 für die OCR-Gruppen.

---

## 6 Diskussion

---

### 6.1 Quantitative *In-Gel*-Aktivitätstests

Wie bereits in den Kapiteln 5.4.1 und 5.4.2 beschrieben, wurden sowohl von den subsarcolemmalen als auch von den interfibrillären Mitochondrien aus Rattenherz *In-Gel*-Aktivitätstests durchgeführt, die durch das Einlesen mittels eines Densitometers quantifiziert werden konnten. Die zu verschiedenen Zeitpunkten entstandenen Graustufen-Bilder wurden mittels Delta2D, einer Software zur Quantifizierung von Proteinspots, ausgewertet und die auf die Proteinmenge des jeweiligen Komplexes normierte Aktivität in dessen individueller Form und als Teil eines Superkomplexes bestimmt. Die Aktivitätstests wurden sowohl für Komplex I als auch für Komplex IV bei beiden Mitochondrienpezies durchgeführt.

Für Komplex I konnte bei den subsarcolemmalen Mitochondrien beobachtet werden, dass für alle untersuchten Gruppen der individuelle Komplex teils nur geringfügig niedrigere Aktivitäten zeigt als Komplex I in den untersuchten Superkomplexen a bis c (Abbildung 5.17, Tabelle 6.1). In allen untersuchten Gruppen zeigen die Superkomplexe a und b die gleiche Aktivität oder eine geringfügig höhere Aktivität für Superkomplex a. Schäfer *et al.*<sup>[154]</sup> konnten hingegen durch In-Lösung-Aktivitätstests von elektroeluiertem Superkomplex a und b aus Rinderherzmitochondrien eine etwa 2,3-fach höhere Aktivität für Superkomplex b gegenüber Superkomplex a nachweisen. Für Komplex IV kann in subsarcolemmalen Mitochondrien ebenfalls wie für Komplex I beobachtet werden, dass der individuelle Komplex weniger Aktivität zeigt als in Superkomplexen. Jedoch kann hier für alle Gruppen eine bis zu 16-fache Aktivitätserhöhung von Komplex IV detektiert werden, wenn dieser mit Komplex III<sub>2</sub> bzw. mit Komplex I und Komplex III<sub>2</sub> zu einem Superkomplex assoziiert (Abbildung 5.23). Dies unterscheidet sich in hohem Maße von den Aktivitätsunterschieden von Komplex I in den subsarcolemmalen Mitochondrien, dessen Änderungen nur knapp das 2-Fache als Maximalwert zeigen. Für das Hirnareal Striatum aus Ratte wurde ebenfalls eine Erhöhung der relativen spezifischen Aktivität von Komplex I auf maximal den doppelten Wert beobachtet, sobald Komplex I mit anderen Atmungsketten zu Superkomplexen assoziiert vorlag<sup>[170]</sup>.

Bei den um bis zu 82% erhöhten Aktivitätswerten von Komplex I (Abbildung 5.17, Tabelle 6.1) infolge des Alterns der *ad libitum* gefütterten Individuen kann es sich nicht um eine Kompensation einer Mengenabnahme von Komplex I handeln, da für dessen Gesamtmenge keine signifikanten Änderungen festgestellt werden konnten (Abbildung 5.63). Wie für Komplex I können ebenso für Komplex IV aus subsarcolemmalen Mitochondrien Erhöhungen der Aktivitäten von bis zu 108% mit dem Alter detektiert werden

(Abbildung 5.23). Da es während des Alterns durch eine größere Anzahl an Protonenlecks zu einer erhöhten Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette<sup>[171]</sup> und der ATP-Generierung und der damit verbundenen Verminderung der protonenmotorischen Kraft kommt<sup>[27]</sup>, könnte eine Erhöhung der Aktivität den Versuch darstellen, einen Teil des Protonenverlustes zu kompensieren. Frenzel<sup>[30]</sup> konnte im Gegensatz zu den hier gezeigten alternsbedingten Änderungen in subsarcolemmalen Rattenherz-Mitochondrien für Mitochondrien aus dem Cortexgewebe von Ratten keine Veränderungen der Komplex I-Aktivität der Superkomplexe a bis d aufgrund des Alternsprozesses detektieren. Die hier erhaltenen Ergebnisse stellen dazu nicht zwangsläufig einen Widerspruch dar, da nicht jedes Gewebe eines Organismus gleich schnell und in gleichem Ausmaß Veränderungen aufgrund von Altern, Krankheiten oder anderen die Zellphysiologie betreffenden Einflüssen ausprägt.

**Tab. 6.1:** Die in subsarcolemmalen Mitochondrien mittels *In-Gel*-Aktivitätstests gemessenen alterns- und CR-bedingten Veränderungen der relativen spezifischen Aktivitäten von Komplex I und Komplex IV. (↑ = Zunahme zwischen 10% und 49%, ↑↑ = Zunahme über 50%, ↓ = Abnahme zwischen 10% und 49%, ↓↓ = Abnahme über 50%, — = keine Veränderung bzw. weniger als 10%)

	Veränderung der Aktivität			
	alternsbedingt		CR-bedingt	
	OAL/YAL	OCR/YCR	YCR/YAL	OCR/OAL
Komplex I individuell	↑↑	↓	↑	↓
Komplex I in Superkomplex a	↑	↓	—	↓
Komplex I in Superkomplex b	↑	↓	↑	↓
Komplex I in Superkomplex c	↑↑	↓	↑	↓
Komplex IV individuell	↑	↓↓	↑↑	↑
Komplex IV in Superkomplex III <sub>2</sub> IV	↑↑	↓	↑↑	↓
Komplex IV in Superkomplex b	↑	↓	↑	↓
Komplex IV in Superkomplex c	↑↑	↓	↑	↓

Durch eine Kalorienrestriktion können je nach Alter der Tiere unterschiedliche Tendenzen beobachtet werden. Während die jungen Tiere, deren Zugang zu Futter eingeschränkt war, Aktivitätssteigerungen zwischen 5% und über 300% im Vergleich zu den jungen *ad libitum* gefütterten Tieren sowohl für die individuellen Komplexe I und IV als auch für alle untersuchten Komplex I- und Komplex IV-enthaltenden Superkomplexe aufweisen, können für die alten CR-Tiere für beide untersuchten Komplexe Aktivitätsabnahmen bis maximal 45% im Vergleich mit den alten Individuen ohne Kalorienrestriktion beobachtet werden. Zusätzlich dazu zeigen die Aktivitäten der jungen CR-Individuen leicht höhere Werte als die der alten Tiere mit applizierter Kalorienrestriktion. Sowohl von Lal *et al.*<sup>[172]</sup> als auch von Bevilacqua *et al.*<sup>[53]</sup> konnte für Skelettmuskel gezeigt werden, dass eine Kalorienrestriktion

---

die Verminderung des alternsbedingten Protonenlecks zur Folge hat. Eine alte Ratte mit Kalorienrestriktion seit jungem Alter könnte demnach durch eine geringere Aktivität der Atmungskettenkomplexe auskommen, um die gleiche protonenmotorische Kraft für die ATP-Synthese zu erzeugen. Obwohl für eine Kalorienrestriktion von 6 Monaten ebenfalls eine Verminderung des Protonenlecks gefunden wurde<sup>[53]</sup>, zeigen die hier untersuchten jungen Tiere mit fünfmonatiger CR höhere Aktivitäten als die Kontrollgruppe. Möglicherweise ist der Beginn einer Kalorienrestriktion im Alter von 6 Wochen zu früh, da sich der Organismus zu diesem Zeitpunkt noch in einer ausgeprägten Wachstumsphase befindet. Eventuell braucht der Metabolismus dadurch deutlich mehr Zeit, um sich an das verminderte Nahrungsangebot anzupassen.

Die interfibrillären Mitochondrien aus Rattenherz zeigen im Vergleich zu den subsarcolemmalen Mitochondrien deutlich weniger Unterschiede der Aktivitäten zwischen den untersuchten Gruppen. Während für die subsarcolemmale Spezies Erhöhungen der Aktivitäten bei den *ad libitum* gefütterten Tieren und Abnahmen bei den CR-Tieren mit dem Alter sowohl für Komplex I als auch für Komplex IV detektiert werden können (Abbildungen 5.17 und 5.23), zeigt sich für die interfibrillären Mitochondrien ein anderes Aktivitätsprofil (Abbildungen 5.29 und 5.35). Für beide untersuchten Komplexe I und IV können zwischen den drei Gruppen YAL, YCR und OAL nur minimale Unterschiede bei den jeweiligen Aktivitätstests detektiert werden. Einzig die OCR-Gruppe zeigt bei beiden Tests deutliche Abweichungen zu den anderen drei Gruppen, wobei die Tendenz gegensätzlich ist. So ist bei Komplex I für den individuellen Komplex und für die drei untersuchten Superkomplexe a bis c eine deutliche Verminderung der Aktivität von durchschnittlich 20% bis 30% je nach (Super-)Komplex zu erkennen (Abbildung 5.29). Superkomplex b beispielsweise zeigt in der Proteinmenge nur äußerst geringe Unterschiede zwischen allen untersuchten Gruppen (Abbildung 5.81), jedoch lässt sich für den Superkomplex eine deutliche Aktivitätsabnahme detektieren. Damit stellt die hier detektierte verminderte Aktivität keine Kompensation einer veränderten Proteinmenge dar. Der individuelle Komplex I zeigt bei der OCR-Gruppe sowohl die kleinste detektierte Proteinmenge (Abbildung 5.78) als auch die geringste Aktivität. Studien konnten belegen, dass Komplex I neben Komplex III die Hauptquelle für die mitochondriale ROS-Produktion darstellt<sup>[9]</sup>. Mit dem Altern steigt die ROS-Produktion und Schädigungen an Proteinen, Lipiden und DNA, die durch ROS hervorgerufen werden, akkumulieren in den Mitochondrien<sup>[173]</sup>. Somit könnte die Verminderung von Komplex I und/oder dessen Aktivität die alternsbedingte erhöhte Generierung von ROS kompensieren. Besonders auffallend bei den Aktivitäten von Komplex I ist die extrem hohe Aktivität aller untersuchten Superkomplexe (Abbildung 5.29).

Diese zeigen eine bis zu 6-fach höhere Aktivität als der individuelle Komplex I, der in einem ähnlichen Aktivitätsbereich liegt wie der von individuellem Komplex I der subsarcolemmalen Mitochondrien (Abbildung 5.17). Der enorme Unterschied der Aktivitäten von individuellem Komplex und Superkomplexen liegt demnach nicht an einer reduzierten Aktivität von individuellem Komplex sondern an einer deutlich gesteigerten Aktivität der Superkomplexe in den interfibrillären Mitochondrien.

Komplex IV hingegen zeigt bei der OCR-Gruppe vornehmlich für die Superkomplexe a und c deutliche Aktivitätssteigerungen von bis zu 100% gegenüber den anderen drei Gruppen, während der individuelle Komplex IV mit Abstand die geringste Aktivität aller untersuchten Proben aufweist. Die Proteomdaten von individuellem Komplex IV (Abbildung 5.80) und Superkomplex b (Abbildung 5.81) zeigen bei beiden so gut wie keine Änderungen in der Proteinmenge zwischen den vier untersuchten Gruppen, daher handelt es sich bei den hier beobachteten Aktivitätserhöhungen für die Superkomplexe a und c nicht um eine Kompensation einer verminderten Proteinmenge. Auffällig ist allerdings die extrem verminderte Aktivität des individuellen Komplex IV von bis zu 83% im Vergleich zum individuellen Komplex der anderen Gruppen. Hierin könnte möglicherweise die beobachtete Aktivitätserhöhung der Superkomplexe a und c begründet sein, da diese den nahezu kompletten Ausfall der Aktivität des individuellen Komplexes kompensieren müssten.

**Tab. 6.2:** Die in interfibrillären Mitochondrien mittels *In-Gel*-Aktivitätstests gemessenen alterns- und CR-bedingten Veränderungen der relativen spezifischen Aktivitäten von Komplex I und Komplex IV.

(↑ = Zunahme zwischen 10% und 49%, ↑↑ = Zunahme über 50%, ↓ = Abnahme zwischen 10% und 49%, ↓↓ = Abnahme über 50%, — = keine Veränderung bzw. weniger als 10%)

	Veränderung der Aktivität			
	alternsbedingt		CR-bedingt	
	OAL/YAL	OCR/YCR	YCR/YAL	OCR/OAL
Komplex I individuell	↑	↓	↑	↓
Komplex I in Superkomplex a	—	↓	↑	↓
Komplex I in Superkomplex b	—	↓	—	↓
Komplex I in Superkomplex c	↑	↓	—	↓
Komplex IV individuell	↑↑	↓↓	↑↑	↓↓
Komplex IV in Superkomplex III <sub>2</sub> IV	↑	↑↑	—	↑
Komplex IV in Superkomplex b	↓	↑↑	↓↓	↑↑
Komplex IV in Superkomplex c	—	↑↑	—	↑↑

Die Methodik der hier durchgeführten *In-Gel*-Aktivitätstests scheint eine gute Alternative zu einer *In-Lösung*-Aktivitätsmessung mittels Spektrometer von elektroeluierten Komplexen und Superkomplexen zu sein. Die hier angewendete Methode ist weniger zeitintensiv als eine



---

Elektroelution aus einer BN-Gelbande, die sogar prinzipiell eine Aktivitätsabnahme nach sich ziehen kann, vor allem wenn eine Vielzahl an Proben und (Super-)Komplexen je Probe untersucht werden sollen. Durch die Dokumentation der optischen Dichte der zu untersuchenden Banden zu verschiedenen Zeitpunkten kann eine Kinetik aufgenommen werden. Dies ermöglicht eine Bestimmung der Aktivität des entsprechenden Komplexes, bevor es zu einer Sättigung kommt. Nachteilig ist der Entfall des Einsatzes von spezifischen Inhibitoren, da diese nicht wie bei *In-Lösung*-Aktivitätstests zu einem beliebigen Zeitpunkt zugegeben werden können. Eine Inhibitorzugabe zum Aktivitätstestpuffer, in dem das Gel inkubiert, führt nicht zur sofortigen Inhibition der Substratumsetzung, da der Inhibitor einige Zeit braucht, um in das Innere der Gelbanden vorzudringen. Es kann ausschließlich ein zweiter Gelstreifen der gleichen Probe in Inhibitor inkubiert werden und anschließend als Kontrolle getrennt von dem auszuwertenden BN-Gelstreifen dem Aktivitätstest unterzogen werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass die spezifische Aktivität des Komplexes innerhalb eines Superkomplexes nur dann bestimmt werden kann, wenn dessen Zusammensetzung bekannt ist, da ausschließlich auf die Proteinmenge des entsprechenden Komplexes innerhalb des Superkomplexes normiert werden darf.

Bei den hier durchgeführten Aktivitätstests für Komplex IV konnten für beide Mitochondrien-spezies Probleme mit der Aktivitätsmessung für Superkomplex b beobachtet werden. Dieser ist in Herzmitochondrien derjenige mit der größten Proteinmenge unter den Superkomplexen und zeigte laut Kinetik in den Abbildungen 5.21, 5.22, 5.33 und 5.34 häufig am wenigsten Aktivität. Dies deckt sich leider nicht ganz mit der Optik der Gele während des Aktivitätstest. Es war bereits früh eine Braunfärbung der Bande sichtbar, allerdings zeigen sich in den Abbildungen 5.20 und 5.32 bei den Absolutwerten für die ersten Zeitpunkte keine Intensitätserhöhungen für diesen Superkomplex. Möglicherweise ist die optische Dichte dieser ausgeprägten scharfen Bande von Superkomplex b durch das gebundene Coomassie aus dem BN-Kathodenpuffer schon so hoch, dass die Bildung von hellbraunem Präzipitat anfangs nicht zu einer Erhöhung der optischen Dichte der Bande führt. Erst nach einiger Zeit ist eine Intensitätserhöhung für Superkomplex b detektierbar. Für den Aktivitätstest für Komplex I konnte jedoch keine solche Plateauphase am Anfang des Tests für die untersuchten Banden beobachtet werden. Des Weiteren war die Auswertung von individuellem Komplex IV schwieriger als bei anderen Banden, weil dieser eine sehr breite und diffuse Bande bildet. Bei der Auswertung muss darauf geachtet werden, dass in den Bildern aller Zeitpunkte exakt die gleichen Grenzen gesetzt werden, vor allem da erst während des voranschreitenden Aktivitätstests die Bandengrenzen deutlicher sichtbar werden.



---

## 6.2 Quantitative Analyse des mitochondrialen Proteoms

### 6.2.1 Mitochondrien aus Herz

Die Isolierung der Mitochondrien aus Skelett- oder Herzmuskelzellen besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Isolierungsschritten, da in Muskelzellen zwei unterschiedliche Mitochondrienspezies vorkommen. Die beiden Spezies, die subsarcolemmalen und die interfibrillären Mitochondrien, müssen nacheinander isoliert werden. Die subsarcolemmalen Mitochondrien können sehr leicht durch mechanischen Aufschluss der Herzmuskelzellen mittels eines Homogenisators isoliert werden. Die interfibrillären Mitochondrien hingegen sind zwischen den Muskelfibrillen eingebettet und können nicht alleine durch mechanische Kräfte aus ihrer schützenden Umgebung herausgelöst werden<sup>[76]</sup>. Dazu müssen die Sedimente aus der Zentrifugation nach dem Homogenisieren mit einer Protease versetzt werden (siehe Kapitel 4.1.3), die die Muskelfibrillen andaut, sodass eine erneute Homogenisierung die Fibrillen zerstören kann und somit die eingeschlossenen Mitochondrien freigesetzt werden können. In früheren Experimenten wurde für die Isolierung der interfibrillären Mitochondrienspezies das Enzym Nagarse verwendet<sup>[76, 79, 90]</sup>, das allerdings mittlerweile nicht mehr kommerziell erhältlich ist. Die Ausbeute der beiden Mitochondrienspezies pro Gramm Gewebe liegt in der Regel bei etwa 10 – 15 mg Protein mit einem Verhältnis von ca. 1:1 bei jungen Ratten<sup>[79, 80]</sup>. Die Ausbeute der interfibrillären Mitochondrien sinkt bei alten Ratten um etwa ein Drittel, während der Wert für die subsarcolemmalen Mitochondrien keine signifikante Veränderung aufweist, sodass sich das Verhältnis auf etwa 3:2 mit dem Alter ändert<sup>[79]</sup>.

In dieser Arbeit konnte für die subsarcolemmalen Mitochondrien aller vier untersuchten Gruppen (jung und alt, jeweils mit und ohne Kalorienrestriktion) eine Ausbeute von etwa 3 - 4 mg Protein pro Gramm Gewebe erzielt werden. Erstaunlicherweise betrug die Ausbeute der interfibrillären Mitochondrien deutlich weniger als die der subsarcolemmalen Spezies. Hier lagen die durchschnittlichen Werte zwischen 0,4 mg und 1,6 mg Protein pro Gramm Gewebe. Allerdings zeigte sich hier bei beiden Alterstufen eine Verdopplung der Ausbeute mit applizierter Kalorienrestriktion. Die durchschnittliche Ausbeute lag für die YAL-Gruppe bei ca. 0,8 mg/g, während die YCR-Gruppe den höchsten Wert mit ca. 1,6 mg/g im Mittel zeigte. Aus den Geweben der OAL-Gruppe konnten mit nur knapp 0,4 mg/g so wenige interfibrilläre Mitochondrien isoliert werden, dass eine Untersuchung der Einzelindividuen nicht möglich war und für die 2D-Gele und die Aktivitätstests bei allen Gruppen ein Probenpool angelegt werden musste. Für die gleiche Altersstufe mit einer applizierten Kalorienrestriktion konnte mit einem Wert von 0,8 mg mitochondriale Proteine pro Gramm Gewebe etwa die doppelte Menge Mitochondrien isoliert werden. Die im Vergleich mit den zuvor beschriebenen

---

Ausbeuten von 10 – 15 mg/g deutlich geringeren Werte der Mitochondrienisolierung in dieser Arbeit könnten auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Wie bereits erwähnt, ist das Enzym Nagarse, das in den früheren Publikationen verwendet wurde, heute nicht mehr erhältlich. Es wäre also möglich, dass die von mir für die Isolierung der Mitochondrien gewählte bakterielle Protease, die vom Hersteller (Sigma, P8038) als Alternative zur Nagarse bezeichnet wurde, die Muskelfibrillen weniger effizient verdaut und damit weniger interfibrilläre Mitochondrien freigesetzt werden können. Nach dem Protokoll der Isolierung beider Mitochondrienspezies aus Herz von Palmer *et al.*<sup>[76]</sup> wird das Enzym zum resuspendierten Sediment hinzugegeben und sofort erneut homogenisiert und zentrifugiert. Bei Vortests an anderen Rattenherzgeweben konnte allerdings auch eine Inkubationszeit von 2 min zwischen Homogenisierung und Zentrifugation die Ausbeute an interfibrillären Mitochondrien nicht erhöhen. Gomez *et al.*<sup>[167]</sup> nutzten das Enzym Subtilisin A als Alternative zur Nagarse, allerdings geben sie leider nicht an, wie hoch die Ausbeute mit diesem Enzym ausgefallen ist. Die Wahl der Protease scheint demnach einen Einfluss auf die Ausbeute an interfibrillären Mitochondrien zu haben, allerdings erklärt diese nicht die im Vergleich zu früheren Publikationen niedrigeren Werte für die Ausbeute der subsarcolemmalen Mitochondrien, die mit dem Enzym idealerweise nicht in Kontakt kommen sollten. Auch hier gibt es Unterschiede in der Isolierungsmethode zum ursprünglichen von Palmer *et al.*<sup>[76]</sup> beschriebenen Protokoll zur Isolierung beider Mitochondrienspezies, in dem das Herzgewebe nach dem Zerkleinern durch ein Skalpell mit einem Polytron-Homogenisator homogenisiert wird. Ein Polytron-Homogenisator zerkleinert das Gewebe durch ein zwischen Scherstreben rotierendes Messer und funktioniert ähnlich wie ein Pürierstab im Haushalt. In meiner Arbeit wurde statt eines Polytrons ein Glas-Teflon-Homogenisator bestehend aus Pistill und Potter verwendet, um das Gewebe zu homogenisieren. Möglicherweise erfolgt die Homogenisierung durch einen Polytron-Homogenisator effektiver und gründlicher als mit einem gewöhnlichen Homogenisator, was zu einer Verringerung der Ausbeute beider Mitochondrienspezies führen könnte. Palmer *et al.*<sup>[76]</sup> verwendeten erst bei der Isolierung der interfibrillären Mitochondrien nach der Zugabe von Nagarse einen Potter-Elvehjem-Homogenisator. Trotz der geringeren isolierten Mitochondrienmengen stand für meine Untersuchungen ausreichend Material zur Verfügung, um alle geplanten Experimente durchführen zu können, auch wenn dafür bei den interfibrillären Mitochondrien ein Probenpool angelegt werden musste.

Die Proteomanalyse wurde durch Färbung von 2D-BN/SDS-Gelen der solubilisierten Mitochondrien mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby und anschließender Quantifizierung der Proteinuntereinheiten mittels der Software Delta2D (Decodon, Greifswald) durchgeführt.

Mithilfe dieser Methodik, der Kombination aus 2D-Gelelektrophorese und Fluoreszenzfärbung, können solubilisierter Membranproteinkomplexe und Superkomplexe sowie deren Untereinheiten voneinander getrennt und einzeln quantifiziert werden. Durch diese Technik ist es möglich, sowohl die Gesamtmenge eines Komplexes als auch deren Untereinheiten zu quantifizieren.

**Tab. 6.3:** Übersicht der in subsarcolemmalen Mitochondrien detektierten alterns- und CR-bedingten Veränderungen der Proteinmenge von Atmungskettenkomplexen, Superkomplexen und anderen mitochondrialen Proteinen. (↑ = Zunahme zwischen 10% und 29%, ↑↑ = Zunahme über 30%, ↓ = Abnahme zwischen 10% und 29%, ↓↓ = Abnahme über 30%, — = keine Veränderung bzw. weniger als 10%)

	Veränderung der Proteinmenge			
	alternsbedingt		CR-bedingt	
	OAL/YAL	OCR/YCR	YCR/YAL	OCR/OAL
Gesamtmenge ATP-Synthase	—	—	—	↓
Monomer/Dimer-Verhältnis	↓↓↓	—	—	↑↑↑
Komplex I	↑	↓	↑↑	↓
Komplex II	—	—	—	↓
Komplex III <sub>2</sub>	↑	—	↓	↓
Komplex IV Oligomere	—	↓	↑	—
Superkomplex III <sub>2</sub> IV	↑↑	—	↑↑	↓
Superkomplex I <sub>1</sub> IV <sub>1</sub>	↑	↓	—	↓↓↓
Superkomplexe a+b	↓	↓	—	—
Superkomplex c	↑↑	—	↑	↓
Superkomplex d	↑↑	↑	↑	↓
HSP60	↑↑	↑	—	↓
Aconitase	—	↑	—	—
Translokase	↓↓↓	—	↓	↑↑

Für die subsarcolemmalen Mitochondrien aus Rattenherz zeigten sich in der Gesamtmenge der ATP-Synthase kaum signifikante Änderungen. Sowohl für die *ad libitum* gefütterten Tiere als auch die Tiere mit applizierter Kalorienrestriktion wurden minimale alternsbedingte Mengenzunahmen von maximal 8% detektiert (Abbildung 5.44, Tab. 6.3), die allerdings aufgrund der äußerst geringen Änderung wohl keine physiologische Relevanz *in vivo* aufweisen dürfte. Auch bei den interfibrillären Mitochondrien ergab sich eine Erhöhung der ATP-Synthase-Menge, jedoch war diese mit Zunahmen von bis zu 26% deutlich stärker ausgeprägt (Abbildung 5.76, Tab. 6.4). Damit ist das Herzmuskelgewebe eines der wenigen Gewebe aus Ratte, das keine alternsabhängige Mengenabnahme der ATP-Synthase aufweist. Bisher konnte das Ausbleiben einer Abnahme der ATP-Synthase-Menge nur für

subsarcolemmale Mitochondrien aus Skelettmuskel durch 2D-DIGE-Analyse nachgewiesen werden<sup>[174, 175]</sup>. Im Gegensatz dazu wurde von Lombardi *et al.*<sup>[176]</sup> durch cDNA-Array gezeigt, dass die Expression einer ATP-Synthase-Untereinheit in subsarcolemmalen Mitochondrien von gealterten Ratten abnimmt. In anderen Geweben der Ratte wie Cortex<sup>[118]</sup>, Cerebrum (Abbildung 5.86), Gesamthirn<sup>[104]</sup> und Leber<sup>[55, 177]</sup> konnte eine Verminderung der ATP-Synthase-Menge detektiert werden. Die gleiche Tendenz einer Mengenabnahme mit dem Alter konnte für andere Modellorganismen wie *Podospora anserina*<sup>[105]</sup> und *Caenorhabditis elegans*<sup>[105]</sup> und ebenso für humane Zellen<sup>[177]</sup> nachgewiesen werden. Der kurzlebige Fisch *Nothobranchius furzeri* zeigt in seinem Muskelgewebe ebenfalls eine Mengenabnahme mit dem Alter, jedoch steigt die Menge zum Ende des Lebens wieder an<sup>[178]</sup>.

**Tab. 6.4:** Übersicht der in interfibrillären Mitochondrien detektierten alterns- und CR-bedingten Veränderungen der Proteinmenge von Atmungskettenkomplexen, Superkomplexen und anderen mitochondrialen Proteinen. (↑ = Zunahme zwischen 10% und 29%, ↑↑ = Zunahme über 30%, ↓ = Abnahme zwischen 10% und 29%, ↓↓ = Abnahme über 30%, — = keine Veränderung bzw. weniger als 10%)

	Veränderung der Proteinmenge			
	alternsbedingt		CR-bedingt	
	OAL/YAL	OCR/YCR	YCR/YAL	OCR/OAL
Gesamtmenge ATP-Synthase	↑	↑	↑↑	↑
Monomer/Dimer-Verhältnis	—	↓	↑	↑
Komplex I	↓	↓	—	—
Komplex III <sub>2</sub>	↓	↓	↓	↓
Komplex IV	↓	—	—	—
Superkomplex b	—	—	—	↑
HSP60	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑

Für das Monomer/Dimer-Verhältnis der ATP-Synthase in den subsarcolemmalen Mitochondrien zeigten sich zwischen den Gruppen der jungen Tiere und den alten Individuen mit Kalorienrestriktion mit minimal höheren Anteilen für das Monomer keine Änderungen, jedoch konnte für die OAL-Gruppe eine deutliche Verschiebung hin zum Dimer beobachtet werden (Abbildung 5.40). Die interfibrillären Mitochondrien zeigten zahlreichere Veränderungen zwischen den Gruppen. So konnte sowohl eine leichte alternsbedingte Abnahme des Monomer/Dimer-Verhältnisses für beide Ernährungsformen als auch eine CR-bedingte Zunahme in beiden Altersstufen detektiert werden (Abbildung 5.74). Bei beiden Mitochondrienspezies bewegten sich die Verhältnisse etwa um den Wert 1 herum, was bedeutet, dass sich die Menge zwischen Monomer und Dimer nicht sehr stark unterscheidet. Bisher ist noch nicht bekannt, ob es Aktivitätsunterschiede zwischen dem Monomer und dem

---

Dimer der ATP-Synthase in Mitochondrien aus Säugerzellen gibt oder ob sogar nur eine der beiden Formen aktiv ist. Für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* deuten indirekte Aktivitätsmessungen darauf hin, dass die mitochondriale  $F_0F_1$ -ATP-Synthase eventuell nur in ihrer dimeren Form Aktivität zeigt, während die ATP-Synthase in Chloroplasten scheinbar in ihrer monomeren Form aktiver ist<sup>[179, 180]</sup>. Dem Dimer und den Homooligomeren der ATP-Synthase wird eine Beteiligung an der Cristae-Bildung zugeschrieben<sup>[117, 181, 182]</sup>. Bei der Di- und Oligomerisierung entsteht abhängig vom Organismus ein Winkel von 35° bis 90° zwischen den monomeren Einheiten, der eine Krümmung der inneren mitochondrialen Membran hervorruft und die Cristae-Bildung und die damit einhergehende Kompartimentierung der Matrix unterstützt<sup>[115, 182, 183]</sup>.

Der individuelle Atmungskettenkomplex I zeigte bei den subsarcolemmalen Mitochondrien der *ad libitum* gefütterten Tiere eine leichte, jedoch signifikante Mengenzunahme mit dem Alter von 14% (Abbildung 5.49). Für Komplex II, Komplex III<sub>2</sub> und die Gesamtmenge von Komplex IV<sub>1-3</sub> konnte hingegen keine signifikante altersbedingte Änderung der Menge detektiert werden (Abbildungen 5.50, 5.51 und 5.55). Die relativen spezifischen Aktivitäten von Komplex I (Abbildung 5.17) und Komplex IV (Abbildung 5.23) in den subsarcolemmalen Mitochondrien zeigten bei den *ad libitum* gefütterten Tieren altersbedingte Aktivitätserhöhungen in allen untersuchten Komplexen und Superkomplexen. In Kombination mit der detektierten Erhöhung bzw. der unveränderten Proteinmenge bewirkt die gesteigerte Aktivität einen höheren Umsatz von NADH an Komplex I bzw. O<sub>2</sub> an Komplex IV in subsarcolemmalen Mitochondrien aus alten Individuen, sowie eine höhere Rate der Protonentranslokation von der Matrix in den Intermembranraum.

In den interfibrillären Mitochondrien zeigte sich für die Proteinmenge der individuellen Komplexe I, III<sub>2</sub> und IV ein gegensätzlicher Trend im Vergleich zu den subsarcolemmalen Mitochondrien. Während diese, wie oben beschrieben, keine Mengenänderungen (II und Gesamtmenge von IV<sub>1-3</sub>) oder sogar leichte Mengenzunahmen (III<sub>2</sub>) aufwiesen, konnte für die interfibrillären Mitochondrien für alle untersuchten individuellen Komplexe eine Mengenabnahme mit dem Alter von bis zu 25% detektiert werden (Abbildungen 5.78, 5.79 und 5.80). Allerdings wurden für die *ad libitum* gefütterten Tiere nur äußerst geringe altersabhängigen Veränderungen der relativen spezifischen Aktivität der Komplexe I (Abbildung 5.29) und IV (Abbildung 5.35) in individueller Form oder als Teil eines Superkomplexes detektiert.

Bereits 1999 konnten Fannin *et al.*<sup>[90]</sup> zeigen, dass die beiden Mitochondrienspezies aus Rattenherz unterschiedliche Phänotypen des Alterns aufweisen. Es konnte eine Abnahme in der oxidativen Kapazität der interfibrillären Mitochondrien aufgrund des Alterns

---

nachgewiesen werden, während in der subsarcolemmalen Spezies keine Veränderung detektiert wurde. Vor diesem Hintergrund scheint die in meiner Arbeit detektierte Mengenabnahme der individuellen Komplexe bei den interfibrillären Mitochondrien mit der von Fannin *et al.*<sup>[90]</sup> detektierten Verminderung der Respiration zu korrelieren. Die detektierte Erhöhung der ATP-Synthase-Menge (Abbildung 5.76) in den interfibrillären Mitochondrien könnte demnach den Versuch einer Kompensation einer verminderten oxidativen Kapazität darstellen, da in Herzmuskelzellen von Ratten keine altersbedingte Veränderung des ATP-Gehalts auftritt<sup>[184]</sup>, während in Skelettmuskel von Ratte<sup>[184, 185]</sup> und Mensch<sup>[186]</sup> eine Abnahme der ATP-Menge von 50% durch das Altern nachgewiesen werden konnte.

Die von Fannin *et al.*<sup>[90]</sup> beobachtete Unveränderlichkeit der subsarcolemmalen Mitochondrien mit dem Alter konnte in meiner Arbeit nicht umfassend bestätigt werden. Zwar zeigten zwei der vier untersuchten individuellen Komplexe (II und IV<sub>1-3</sub>) bei den *ad libitum* gefütterten Tieren keine altersbedingten Änderungen, jedoch wurden für zwei Komplexe (I und III<sub>2</sub>) eine, wenn auch nur leichte, Mengenzunahme detektiert. In Skelettmuskel konnten Lombardi *et al.*<sup>[176]</sup> über ein cDNA-Array jedoch eine verminderte Genexpression von 50% einer Untereinheit von Komplex IV in subsarcolemmalen Mitochondrien detektieren. In Mitochondrien aus Cerebrum, das aus den selben Individuen wie die hier untersuchten Herzmitochondrien entnommen wurde, zeigten sich ebenfalls wie für die subsarcolemmalen Mitochondrien aus Herz altersbedingte Mengenzunahmen für die Komplexe I und III<sub>2</sub>, die allerdings aufgrund der hohen Standardabweichung keine Signifikanz aufweisen (Abbildungen 5.89 und 5.90). Ebenso zeigt der Vergleich der Menge von Komplex IV zwischen Cerebrum und subsarcolemmalen Herzmitochondrien den gleichen Effekt, da bei beiden keine altersabhängige Änderung nachgewiesen werden konnte (Abbildung 5.91).

Die Effekte einer Kalorienrestriktion auf die Proteinmengen der untersuchten Atmungskettenkomplexe sind bisher wenig bekannt. Die hier detektierten Änderungen sowohl in den subsarcolemmalen als auch in den interfibrillären Mitochondrien stellten sich als recht inkonsistent dar und sind damit schwer erklärbar. Bei Komplex I der subsarcolemmalen Mitochondrien konnte für die jungen Tiere eine deutliche Mengenzunahme von 40% aufgrund der Kalorienrestriktion detektiert werden, während sich im Gegensatz dazu für die alten Tiere eine Abnahme von 16% ergab (Abbildung 5.49). Komplex III<sub>2</sub> zeigte bei beiden Altersstufen eine geringe Mengenabnahme mit applizierter Kalorienrestriktion von bis zu 17%, wobei nur die Abnahme bei den alten Individuen eine Signifikanz aufwies (Abbildung 5.51). Bei der Gesamtmenge der Oligomere von Komplex IV konnte ausschließlich für die jungen Tiere eine signifikante Zunahme von 27% detektiert werden, während bei den alten Individuen keine Änderung beobachtet werden konnte (Abbildung 5.55). Die interfibrillären Mitochondrien hingegen zeigten für Komplex I und für

---

Komplex III<sub>2</sub> leichte bis deutliche CR-bedingte Mengenabnahmen bei beiden Altersstufen (Abbildungen 5.78, 5.79 und 5.80), während für Komplex IV bei den jungen Individuen keine Änderung und bei den alten Tieren eine minimale CR-bedingte Zunahme detektiert wurde. Der Vergleich mit den individuellen Atmungskettenkomplexen aus Cerebrum derselben Tiere zeigte ebenfalls keine Konsistenz der detektierten Änderungen. Allenfalls die CR-bedingten Änderungen für die Komplexe I und III<sub>2</sub> in den Hirnmitochondrien der jungen Tiere (Abbildungen 5.89 und 5.90) zeigten die selbe Tendenz wie in den interfibrillären Herzmitochondrien (ausführlicher Vergleich von Herz und Hirn siehe Kapitel 6.2.2). In Leber konnten für alte Ratten CR-bedingte Abnahmen der Proteinmengen von Komplex I und Komplex IV detektiert werden<sup>[55]</sup>. Ein vergleichbarer Effekt der Kalorienrestriktion in alten Individuen wurde für die in meiner Arbeit analysierten Herzmitochondrien nur für Komplex I beobachtet, allerdings in beiden untersuchten Mitochondrienspezies.

Die quantifizierten Superkomplexe in den subsarcolemmalen Mitochondrien zeigten ein sehr differenziertes Bild der alternsbedingten Änderungen. Für die beiden kleinsten detektierten Superkomplexe III<sub>2</sub>IV (Abbildung 5.57) und I<sub>1</sub>IV<sub>1</sub> (Abbildung 5.58), sowie die beiden größten quantifizierten Superkomplexe c (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>, Abbildung 5.61) und d (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>3</sub>, Abbildung 5.62) konnten für die *ad libitum* gefütterten Tiere jeweils signifikante Mengenzunahmen mit höherem Alter beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnten für diese Superkomplexe bei den CR-Tieren für drei der vier untersuchten Komplexe keine signifikanten alternsbedingten Änderungen der Proteinmenge detektiert werden. Einzig für Superkomplex I<sub>1</sub>IV<sub>1</sub> wurde bei den Tieren mit Kalorienrestriktion eine signifikante Mengenabnahme mit dem Alter (Abbildung 5.58) beobachtet. Die Superkomplexe a (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>) und b (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>) zeigten völlig gegensätzlich zu den anderen Superkomplexen signifikante alternsbedingte Abnahmen der detektierten Proteinmengen unabhängig von der Kalorienzufuhr der Individuen (Abbildungen 5.59 und 5.60). Jedoch konnte bei den *ad libitum* gefütterten Tieren für alle untersuchten Superkomplexe a bis c, die alle Komplex I enthalten, eine alternsbedingte Erhöhung der relativen spezifischen NADH-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden, während bei den CR-Tieren im Alter eine Aktivitätsabnahme der gleichen Superkomplexe auftrat (Tabelle 5.3 und Abbildung 5.17). Die gleichen Tendenzen der alternsbedingten Zu- bzw. Abnahmen wurden ebenso für die auf Aktivität von Komplex IV untersuchten Superkomplexe III<sub>2</sub>IV, b und c beobachtet (Tabelle 5.4 und Abbildung 5.23). Die hier in den subsarcolemmalen Rattenherzmitochondrien detektierten Änderungen der Proteinmengen der Superkomplexe zeigten teilweise ähnliche Tendenzen wie der von Lombardi *et al.*<sup>[176]</sup> untersuchte Skelettmuskel aus Ratte. Lombardi *et al.*<sup>[176]</sup> wiesen nach, dass sich die Menge der Superkomplexe a und b im Alter reduziert, während die größeren Superkomplexe c und



---

d keine alternsbedingte Änderung detektiert wurden. Die Reduzierung der Menge von Superkomplex a und b konnte in meiner Arbeit für die subsarcolemmalen Rattenherz-mitochondrien ebenfalls beobachtet werden, ebenso ist keine alternsabhängige Mengenabnahme für die Superkomplexe c und d detektiert worden. Für die größten beiden Superkomplexe wurden sogar leichte Mengenzunahmen nachgewiesen werden. Dies steht in Kontrast zu den von Gomez et al.<sup>[167]</sup> gefundenen Änderungen in der anderen Mitochondrienspezies, den interfibrillären Mitochondrien. Dort konnte gezeigt werden, dass sich die Menge der hochmolekularen Superkomplexe c und d mit dem Alter in signifikanten Mengen von bis zu 25% vermindert, die Superkomplexe a und b jedoch keine Änderungen aufweisen. Die in meiner Arbeit beobachteten Mengenzunahmen der kleinsten in den subsarcolemmalen Mitochondrien detektierten Superkomplexe III<sub>2</sub>IV und I<sub>1</sub>IV<sub>2</sub> könnten möglicherweise auf eine alternsbedingte Degradation der beiden größeren Superkomplexe a und b zurückzuführen sein. Bei Ratten mit Herzinsuffizienz konnte ebenfalls eine Mengenabnahme von Superkomplex b gefunden werden, die mit einer verminderten Respirationsrate in Zusammenhang zu stehen scheint<sup>[80]</sup>.

Eine Kalorienrestriktion bewirkte in den hier untersuchten subsarcolemmalen Mitochondrien aus Rattenherz ein differenziertes Verhalten in den beiden untersuchten Altersstufen. Für die jungen Tiere konnten für einige der quantifizierten Superkomplexe keine signifikanten Änderungen der Proteinmenge detektiert werden. Abgesehen von Superkomplex b (Abbildung 5.60) zeigten alle weiteren fünf Superkomplexe zwar den Trend einer leichten Mengenzunahme mit applizierter Kalorienrestriktion, allerdings wies nur die Erhöhung der Proteinmenge von Superkomplex c (Abbildung 5.61) eine statistische Signifikanz auf. Im Gegensatz dazu konnte bei den alten Individuen bei vier der sechs untersuchten Superkomplexe eine signifikante Mengenabnahme nachgewiesen werden, einzig die Superkomplexe a und b zeigten keine Änderung. Zusammen mit den CR-bedingten verminderten Mengen der individuellen Komplexe I und III<sub>2</sub> in alten Tieren deutet dies auf eine deutliche Mengenabnahme von Atmungskettenkomplexen infolge der Kalorienrestriktion hin. Zusätzlich dazu wurde für alle auf Aktivität von Komplex I und Komplex IV untersuchten Superkomplexe in alten CR-Tieren eine Verminderung der relativen spezifischen Aktivität beobachtet worden. Es ist seit 80 Jahren bekannt, dass eine Kalorienrestriktion bei Ratten eine Lebensverlängerung bewirkt<sup>[35]</sup> und eine Abnahme der Atmungskettenkomplexe hat auf den ersten Blick keine Vorteile, auf die die positive Wirkung der Kalorienrestriktion zurückgeführt werden könnte. Allerdings könnte hier wie von Lal et al.<sup>[172]</sup> und Bevilacqua et al.<sup>[53]</sup> für den Skelettmuskel beschrieben, eine Verringerung des Protonenlecks der inneren Mitochondrienmembran zu einer effizienteren Atmungskette führen, die mit einer verminderten Menge an Atmungskettenkomplexen auskommt. Ebenso vermindert eine



---

Reduktion der Menge und der Aktivität von Komplex I die ROS-Produktion, da dieser einer der Hauptorte ist, an denen ROS entstehen<sup>[9]</sup>.

Bei den hier untersuchten interfibrillären Mitochondrien aus Rattenherz konnte ausschließlich Superkomplex b in den 2D-Gelen quantifiziert werden. Für diesen Superkomplex wurde keine Mengenänderung mit dem Alter oder einer Kalorienrestriktion detektiert (Abbildung 5.81). Dies stimmt mit den von Gomez et al.<sup>[167]</sup> erzielten Ergebnissen in interfibrillären Rattenherzmitochondrien überein, die mittels Densitometrie und Western Blotting von BN-Gelen für die Superkomplexe a und b keine altersbedingte Änderung der Proteinmenge nachweisen konnten, sondern ausschließlich eine Mengenabnahme für höher-molekulare Superkomplexe. Die in meiner Arbeit auf Aktivität von Komplex I und Komplex IV untersuchten Superkomplexe der interfibrillären Mitochondrien zeigten in Summe keine Veränderung der relativen spezifischen Aktivität (Abbildungen 5.29 und 5.35).

Die ADP/ATP-Translokase 1, die in den subsarcolemmalen Mitochondrien quantifiziert werden konnte, zeigt sowohl für *ad libitum* gefütterte Tiere als auch für Ratten mit applizierter Kalorienrestriktion eine altersbedingte Proteinmengenabnahme (Abbildung 5.69). Durch eine Kalorienrestriktion konnte bei jungen Tieren eine Mengenabnahme beobachtet werden, während bei den alten Individuen eine CR-bedingte Zunahme detektiert wurde. Die ADP/ATP-Translokase ist ein Antiporter in den Mitochondrienmembranen und ist essentiell für den Export von ATP aus den Mitochondrien in das Cytosol und den Import von ADP in die Mitochondrien. Die ADP/ATP-Translokase-Aktivität weist in Mitochondrien aus Rattenherz eine altersabhängige Abnahme auf<sup>[21, 28, 187]</sup>. Der ADP-Import aus dem Cytosol in die Mitochondrien ist vermutlich aufgrund der veränderten Lipidumgebung durch das Altern um mehr als 30% vermindert<sup>[28]</sup>. Der Cardiolipin-Gehalt sinkt im Gegensatz zu anderen Phospholipiden in gealterter mitochondrialen Membranen aus Rattenherz um etwa 40% und beeinflusst nicht nur die Stabilität und die Aktivität von Atmungskettenkomplexen und -Superkomplexen, sondern scheinbar auch die der ADP/ATP-Translokase<sup>[28]</sup>. Wenn im Alter neben der Aktivitätsverminderung der Translokase zusätzlich, wie hier in dieser Arbeit für subsarcolemmale Mitochondrien gezeigt, deren Menge in den Mitochondrienmembranen sinkt, ist dies eine starke Einschränkung des Energiemetabolismus der Zelle. Dadurch kann weniger ATP an die Stellen in der Zelle transportiert werden, wo Energie gebraucht wird und im umgekehrten Fall wird weniger ATP erzeugt, da eine geringere Menge an ADP zur Phosphorylierung bereit steht. Eine Kalorienrestriktion im Alter bewirkte eine Erhöhung der Translokase-Menge im Vergleich zu den normal gefütterten alten Tieren (Abbildung 5.69), die zwar nicht wieder die Menge der jungen *ad libitum* gefütterten Tiere erreichte, jedoch den Verlust der Translokase-Proteine einschränkte. Im Gegensatz dazu konnte für die jungen

---

Tiere mit applizierter Kalorienrestriktion nicht nur keine erhöhte Menge an ADP/ATP-Translokase detektiert werden, sondern sogar eine CR-bedingte Abnahme. In jungem Alter scheint die Kalorienrestriktion, zumindest für die ADP/ATP-Translokase und damit für den Nukleotidtransport zwischen Matrix und Cytosol, einen negativen Effekt aufzuweisen, im Alter dagegen kehrt sich der Effekt ins Positive um. Hier könnte demnach ein Hormesis-Effekt zugrunde liegen. Das bedeutet in diesem Fall, dass ständige leichte Stressreize in Form von Kalorienrestriktion die Fähigkeit der Mitochondrien bzw. der ganzen Zelle fördern, schneller und effizienter auf jegliche Stressreize, die im Laufe des Alterns auftreten, zu reagieren und diese teilweise kompensieren zu können. Prinzipiell kann dieser Effekt wie eine Impfung mit kleinen Stressreizen angesehen werden, mit dem Ziel, großen Stress durch vorherige Aktivierung von Abwehrmechanismen effizienter und schneller ausgleichen zu können<sup>[188]</sup>.

HSP60 zeigte in den beiden untersuchten Mitochondrienspezies altersbedingte Erhöhungen der Proteinmenge, unabhängig von der Kalorienzufuhr der Tiere. In subsarcolemmalen Mitochondrien betrug die Mengenzunahme signifikante 45% bei den *ad libitum* gefütterten Tieren und nicht-signifikante 16% bei den CR-Tieren (Abbildung 5.65). In den interfibrillären Mitochondrien konnten sogar noch deutlich größere Mengenzunahmen beobachtet werden. Für die *ad libitum* gefütterten Tiere verfünffachte sich die Menge an HSP60, während für die Individuen mit applizierter Kalorienrestriktion eine altersbedingte Zunahme von 54% beobachtet werden konnte (Abbildung 5.82). Generell lagen die Mengen an HSP60 in interfibrillären Mitochondrien deutlich unter denen der subsarcolemmalen Mitochondrien. Bei HSP60 handelt es sich nicht nur um ein mitochondriales Chaperon, das verhindert, dass sich Proteine fehlerhaft falten und unspezifische Proteinaggregate bilden, sondern auch um einen Biomarker für Stress. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Expressionsrate von HSP60 durch verschiedene Formen von Stress erhöht. Aufgrund dessen wird angenommen, dass HSP60 eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von durch ROS und RNS ausgelösten neurotoxischen Störungen infolge von Altern oder Krankheiten spielt<sup>[159]</sup>. Der hier in beiden Herzmitochondrienspezies ermittelte altersbedingte Anstieg der HSP60-Menge deutet auf gesteigerten oxidativen Stress während des Alterns in den Mitochondrien hin. Chung und Ng<sup>[189]</sup> detektierten für Skelettmuskelzellen ebenfalls einen Anstieg der HSP60-Menge infolge des Alterns, während in anderen Geweben, wie in den Hirnregionen Cortex und Striatum, eine altersbedingte Abnahme der Proteinmenge beobachtet werden konnte<sup>[30]</sup>. Eine Kalorienrestriktion bewirkt in den beiden Spezies allerdings nicht den gleichen Effekt. Während in den subsarcolemmalen Mitochondrien bei den jungen Tieren keine signifikante Mengenänderung und bei den alten Individuen eine leichte, aber signifikante Abnahme von 16% detektiert wurde (Abbildung 5.65), konnte für

---

beide Altersstufen der interfibrillären Mitochondrien eine sehr deutliche Mengenzunahme mit applizierter Kalorienrestriktion detektiert werden. Bei den jungen Tieren verzehnfachte sich die Menge an HSP60, bei den alten Tieren verdreifachte sie sich (Abbildung 5.82). Während demnach in den subsarcolemmalen Mitochondrien durch die Kalorienrestriktion keine Änderung bzw. eine leichte Verminderung der HSP60-Menge ausgelöst wurde, was vermutlich auf ein damit verbundenes vermindertes Stressniveau hindeutet, zeigen die extrem hohen Proteinmengenzunahmen in den interfibrillären Mitochondrien eventuell ein deutlich gesteigertes Stressniveau durch die Kalorienrestriktion an.

Die Aconitase konnte in dieser Arbeit nur in den subsarcolemmalen Mitochondrien quantifiziert werden. Das Schlüsselenzym des Citratzyklus zeigte keine signifikanten Veränderungen aufgrund von Altern oder einer Kalorienrestriktion (Abbildung 5.66). Es wurde schon mehrfach nachgewiesen, dass die Aconitase keinen Mengenänderungen infolge des Alterns unterworfen ist und wird daher als ein „housekeeping“-Protein angesehen. Sowohl in Rattenhirn, als auch in anderen Organismen wie dem filamentösen Pilz *Podospora anserina*, Insekten und humanen Zellen konnten keine altersabhängigen Änderungen der Enzymmenge festgestellt werden<sup>[103, 177, 190]</sup>. Nichtsdestotrotz zeigt die Aconitase Alterserscheinungen, die sich allerdings nur in einer verminderten Aktivität des Enzyms durch posttranslationale Modifikation widerspiegeln, was in verschiedenen Geweben von Säugern und in Insekten nachgewiesen wurde<sup>[190-192]</sup>.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die beiden Mitochondrienspezies unterschiedlich auf das Altern und die Kalorienrestriktion reagieren. Fannin *et al.*<sup>[90]</sup> postulierten die These, dass von beiden Mitochondrienspezies ausschließlich die interfibrillären Mitochondrien altersassoziierte Veränderungen der oxidativen Kapazität ausprägen. Diese These konnte in dieser Arbeit zwar weder widerlegt noch bestätigt werden, allerdings zeigt die hier vorgenommene Proteomanalyse beider Spezies, dass auch die subsarcolemmalen Mitochondrien teils signifikante Änderungen der Menge von Atmungskettenkomplexen mit dem Alter und mit Kalorienrestriktion aufweisen. Es scheint unwahrscheinlich, dass sich diese Veränderungen nicht auf die Effizienz der gesamten oxidativen Phosphorylierung auswirken. Um die Effekte von Altern und Kalorienrestriktion auf Proteomebene in interfibrillären Mitochondrien endgültig aufzuklären, sollten allerdings weitere Untersuchungen mit einer anderen Methodik, die auf eine SDS-Gelelektrophorese verzichtet, durchgeführt werden, um die Problematik mit der bei der Isolierung zugegebenen Protease (siehe Kapitel 5.3) zu minimieren.

---

## 6.2.2 Mitochondrien aus Hirn

Bei dem in meiner Arbeit analysierten Hirngewebe aus *Rattus norvegicus* handelt es sich um das Großhirn, auch Cerebrum genannt, das neben den Basalganglien und dem limbischen System zum größten Teil aus Cortexgewebe besteht. Die Besonderheit der hier untersuchten Hirnproben liegt in der Herkunft der Gewebe, da diese denselben Tieren entnommen wurden, aus denen auch das in meiner Arbeit analysierte Herzgewebe stammt. Durch diesen Umstand ist auszuschließen, dass sich detektierbare Unterschiede auf Proteomebene der beiden verschiedenen Gewebetypen nicht auf zufällige Unterschiede bei der Stichprobenauswahl von Tieren einer Population zurückführen lassen. Stattdessen können detektierte Unterschiede zwischen beiden Probengeweben tatsächlich einer Gewebespezifität zugeordnet werden.

Die alternsbedingten Änderungen bei den *ad libitum* gefütterten Tieren zeigten bei einem unverändertem Monomer/Dimer-Verhältnis (Abbildung 5.85 und Tabelle 6.5) eine Abnahme der Gesamtmenge der ATP-Synthase (Abbildung 5.86). Bisher wurde bereits in verschiedenen Geweben der Ratte eine solche alternsbedingte Abnahme der ATP-Synthase-Menge beobachtet<sup>[55, 104, 118, 177]</sup>. Die gleiche Tendenz einer Mengenabnahme mit dem Alter konnte für andere Modellorganismen wie *Podospora anserina*<sup>[105]</sup> und *Caenorhabditis elegans*<sup>[105]</sup> und ebenso für humane Zellen<sup>[177]</sup> nachgewiesen werden. Der freie  $F_1$ -Teil der ATP-Synthase, der auch in den hier untersuchten Hirnmitochondrien quantifiziert wurde, kann zwar ATP binden und zeigt katalytische Aktivität, aber ohne die Membrankomponente der ATP-Synthase ist er nicht in der Lage, ATP zu generieren, im Gegenteil, es kommt durch die Rückreaktion sogar zur Hydrolyse von ATP. Noch ungeklärt ist der Grund für das Vorkommen des  $F_1$ -Teils. Diese könnten durch Degradation der ATP-Synthase-Komplexe entstanden sein oder es könnte sich um eine Art Pool von nicht assemblierten Molekülen handeln, der als eine Art Speicher für die schnelle Bereitstellung von neuen ATP-Synthase-Molekülen fungiert. Es konnte gezeigt werden, dass der freie  $F_1$ -Teil unabhängig von den Solubilisierungsbedingungen auftritt<sup>[118]</sup>. Eine Erhöhung des Anteils von freiem  $F_1$  im Vergleich zur Gesamtmenge der ATP-Synthase kann durch die Hydrolyse von ATP den Energiehaushalt der Zelle negativ beeinflussen. In den hier untersuchten Hirnmitochondrien konnte bei den *ad libitum* gefütterten Tieren etwas mehr als eine Verdopplung des Anteils des detektierbaren  $F_1$ -Teils von 2,5% auf 5,6% mit dem Alter nachgewiesen werden (Abbildung 5.87). Auch eine Kalorienrestriktion erhöht in beiden Altersstufen im Vergleich zur YAL-Gruppe den Anteil deutlich, erreicht aber nicht den Wert der OAL-Gruppe. Bei den alten Tieren erfolgt durch die Kalorienrestriktion eine geringe Kompensation der alternsbedingten Erhöhung des Anteils von freiem  $F_1$ -Teil durch eine Verminderung dessen um 0,7 Prozentpunkte auf 4,9%. Eine

altersbedingte Erhöhung des Anteils von F<sub>1</sub> wurde bereits für Rattenhirn<sup>[30]</sup> und andere Organismen wie *Podospora anserina*<sup>[105]</sup> in einem ähnlichen Ausmaß sowohl für den Anteil als auch bei den detektierten Veränderungen beobachtet.

**Tab. 6.5:** Übersicht der in Mitochondrien aus Rattenhirn (Cerebrum) detektierten alters- und CR-bedingten Veränderungen der Proteinmenge von Atmungskettenkomplexen, Superkomplexen und anderen mitochondrialen Proteinen. (↑ = Zunahme zwischen 10% und 29%, ↑↑ = Zunahme über 30%, ↓ = Abnahme zwischen 10% und 29%, ↓↓ = Abnahme über 30%, — = keine Veränderung bzw. weniger als 10%)

	Veränderung der Proteinmenge			
	altersbedingt		CR-bedingt	
	OAL/YAL	OCR/YCR	YCR/YAL	OCR/OAL
Gesamtmenge ATP-Synthase	↓	↑↑	↓↓	↓
Monomer/Dimer-Verhältnis	—	—	—	—
Anteil F <sub>1</sub> -Teil	↑↑	↑	↑↑	↓
Komplex I	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑
Komplex III <sub>2</sub>	↑	↑↑	↓↓	—
Komplex IV	—	↑↑	↓↓	↓
Superkomplex III <sub>2</sub> IV	↑	↑↑	↓↓	↓
Superkomplex a	—	↑↑	↓↓	↓
Superkomplex b	↓↓	—	↓↓	↓↓
Superkomplex c	↑↑	↑↑	↓↓	↓
Aconitase	↓↓	↑	↓↓	↓

Für die Summe der detektierten Untereinheiten von individuellem Komplex I wurde bei den *ad libitum* gefütterten Tieren eine deutliche altersbedingte Zunahme der Proteinmenge detektiert (Abbildung 5.89), jedoch betrug der Anteil vom individuellen Komplex an der Gesamtmenge von Komplex I (Abbildung 5.95) nur 6% (YAL) bzw. 11% (OAL). In Cortex aus Wistar-Ratten wurde hingegen kaum individueller Komplex I gefunden (< 5%), das heißt fast alle NADH-Dehydrogenase-Komplexe lagen zu Superkomplexen assoziiert vor<sup>[118]</sup>. Für die Superkomplexe III<sub>2</sub>IV und c wurden altersbedingte Mengenzunahmen ermittelt, während Superkomplex b, wie bereits für Cortex ermittelt<sup>[118]</sup>, eine Mengenabnahme zeigte.

Erstaunlicherweise konnte für die Aconitase eine deutliche Mengenabnahme mit dem Alter und der Kalorienrestriktion festgestellt werden (Abbildung 5.96, Tabelle 6.5). Für das Enzym des Citratzyklus konnte bisher sowohl in Cortex und Striatum von Ratte, als auch in anderen Organismen wie dem filamentösen Pilz *Podospora anserina*, Insekten und humanen Zellen keine altersabhängigen Änderungen der Enzymmenge<sup>[103, 177, 190]</sup> beobachtet werden, weshalb es auch häufig als „housekeeping“-Protein angesehen wird. Die detektierten

---

alternsbedingten Veränderungen der Aconitase spiegeln sich nur in einer verminderten Aktivität des Enzyms durch posttranslationale Modifikation wider, was in verschiedenen Geweben von Säugern und in Insekten nachgewiesen wurde<sup>[190-192]</sup>. Einzig für ein Hirnareal, den Hippocampus, von Ratte wurde bisher eine alternsbedingte Änderung der Aconitase-Menge nachgewiesen<sup>[30]</sup>.

Bezüglich der Effekte der Kalorienrestriktion ist besonders auffällig, dass bei nahezu allen untersuchten Atmungskettenkomplexen die Gruppe der jungen Tiere (YCR) eine teils drastische Verminderung der Proteinmenge aufwies (Tabelle 6.5). Erfolgte die Kalorienrestriktion der Tiere allerdings lebenslang bis ins fortgeschrittene Alter, zeigten sich ebenfalls für alle untersuchten OxPhos-Komplexe höhere Proteinmengen (OCR) im Vergleich mit den jungen CR-Tieren. Eine längere Kalorienrestriktion ist demnach in der Lage, die sehr deutlichen Mengenabnahmen, die durch die reduzierte Kalorienaufnahme in jungen Jahren im Cerebrumgewebe entstehen, partiell oder gänzlich umzukehren oder sogar für den individuellen Komplex I (Abbildung 5.89) eine Überkompensation hervorzurufen. Trotz der Kompensationseffekte bei den alten CR-Tieren liegen die detektierten Proteinmengen dieser Gruppe für nahezu alle detektierten Komplexe und Superkomplexe mindestens 10% unter denen der alten Ratten, die *ad libitum* gefüttert wurden.

Solche starken Veränderungen, wie sie für die Gruppen der CR-Tiere aufgetreten sind, speziell wenn diese nur in eine Richtung auftreten, könnten eventuell darauf hindeuten, dass diese einem methodischen Fehler zugrunde liegen. Für die hier untersuchten Hirnmitochondrien wurde eine externe Normierung auf die Proteinmenge in SDS-Gelen und die Färbeintensität der Markerbanden in den 2D-BN/SDS-Gelen durchgeführt. Da die auf das SDS-Gel aufgetragene Probe aus derselben Solubilisierung stammt wie die Probe, die für die 2D-PAGE verwendet wurde, können auf diese Weise Unterschiede in der Solubilisierungseffizienz und der daraus resultierenden aufgetragenen Proteinmenge herausgerechnet werden. Eine solche externe Normierung kann allerdings nicht alle möglichen Fehlerquellen wie ein leicht verändertes Probenvolumen beim Auftrag auf das Gel eliminieren, sodass die Veränderung der Proteinmenge eventuell fälschlicherweise der Probe zugeschrieben wird und die sich daraus ergebenden Fehler eine ungenaue Normierung nach sich ziehen. Eine interne Normierung auf die Gesamtsumme aller detektierbaren Proteinspots auf dem Gel, wie sie von mir für die Mitochondrien aus Rattenherz verwendet wurde, kann solche Effekte eliminieren. Da die Analyse der Hirnproben in der Anfangsphase meiner Labortätigkeit erfolgte und ich die hier angewendete Art der internen Normierung erst später entwickelte, wurde die externe Normierung gewählt. Demnach sollten die für die Hirnmitochondrien angefertigten 2D-Gele erneut ausgewertet

---

und ebenso wie die Herzmitochondrien auf die Gesamtsumme aller Proteine normiert werden, um zu beweisen, dass die hier detektierten Veränderungen vor allem bei den CR-Tieren tatsächliche Proteinmengenänderungen aufgrund von Altern oder der Kalorienrestriktion darstellen. Ein Hinweis darauf, dass die Normierung bei diesen Proben nicht allzu stark fehlerbehaftet sein kann, gibt die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge der ATP-Synthase und des freien  $F_1$ -Teils. Die Gesamtmenge der ATP-Synthase zeigte mit dem Alter eine Mengenabnahme, während für den  $F_1$ -Teil eine Mengenzunahme detektiert wurde. Beides wurde bereits für Mitochondrien aus Cortex von Wistar-Ratten gezeigt<sup>[30]</sup>.

Der Vergleich der Hirnmitochondrien mit den beiden Mitochondrienspezies aus Herz, die alle aus denselben Individuen stammen, ergibt teils deutliche Unterschiede hinsichtlich der alterns- und CR-bedingten Effekte auf die Proteinmengen der Atmungskettenkomplexe und Superkomplexe. Da sich die subsarcolemmalen und interfibrillären Mitochondrien aus Herz bezüglich der Mengenänderungen von Atmungskettenkomplexen voneinander unterscheiden, können Hirn- und Herzgewebe nicht als zwei verschiedene Gewebe miteinander verglichen werden, sondern es müssen alle drei verschiedenen Mitochondrienpopulationen für den Vergleich herangezogen werden.

Es fällt auf, dass die Hirnmitochondrien bezüglich der alternsabhängigen Mengenänderungen bei den *ad libitum* gefütterten Tieren eher denen der subsarcolemmalen Mitochondrien aus Herz ähneln. Für die individuellen Komplexe I und  $III_2$  wurden für beide Mitochondrienspezies Mengenabnahmen mit dem Alter detektiert, während Komplex IV keine Mengenänderungen zeigte. In interfibrillären Mitochondrien aus Herz konnte dagegen für jeden der drei individuellen Komplexe eine Abnahme detektiert werden. Bei den subsarcolemmalen Mitochondrien aus Herz ergab sich für die zwei kleinsten ( $III_2IV$  und  $I_1IV_1$ ) und die beiden größten Superkomplexe ( $I_1III_2IV_2$  und  $I_1III_2IV_3$ ) eine alternsbedingte Mengenzunahme und eine Mengenabnahme für die Superkomplexe a und b ( $I_1III_2$  und  $I_1III_2IV_1$ ). In Hirnmitochondrien konnten von den sechs genannten Superkomplexen nur vier detektiert werden, die allerdings ein ähnliches Verhalten aufgrund des Alterns aufzeigten. Für den kleinsten ( $III_2IV$ ) und den größten detektierten Superkomplex (c,  $I_1III_2IV_2$ ) wurde ebenfalls eine Mengenzunahme beobachtet, während die Superkomplexe a und b ( $I_1III_2$  und  $I_1III_2IV_1$ ) keine Änderung (a) bzw. eine Mengenabnahme (b) zeigten. Bei beiden Mitochondrienspezies aus Herz wurde für die Gesamtmenge der ATP-Synthase eine Mengenzunahme mit dem Alter detektiert, die jedoch für die subsarcolemmalen Mitochondrien mit nur 8% sehr gering ausfiel. Im Gegensatz dazu wurde allerdings für die Hirnmitochondrien eine alternsbedingte Mengenabnahme beobachtet. Bei der Gesamtmenge der ATP-Synthase kann demnach tatsächlich von einer Gewebespezifität gesprochen werden.



---

Bezüglich der Effekte der Kalorienrestriktion konnten sehr deutliche Unterschiede zwischen den Hirnmitochondrien und den beiden Mitochondrienspezies aus Herz festgestellt werden. Während durch die Kalorienrestriktion in jungen Tieren für alle individuellen Atmungskettenkomplexe, Superkomplexe und die ATP-Synthase aus Hirnmitochondrien teils sehr deutliche Mengenabnahmen beobachtet wurden, zeigten diese bei beiden Mitochondrienspezies aus Herz häufig Mengenzunahmen oder keine Änderungen, jedoch nur sehr selten eine Abnahme der Proteinmenge. Erfolgte die Kalorienrestriktion bis ins hohe Alter der Tiere, konnten für die subsarcolemmalen Mitochondrien aus Herz und die Hirnmitochondrien fast ausschließlich Mengenabnahmen detektiert werden im Vergleich mit der Gruppe der alten Tiere, die *ad libitum* gefüttert wurden. Bei den interfibrillären Mitochondrien konnten hingegen keine Änderungen oder Mengenzunahmen beobachtet werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die hier detektierten altersbedingten Mengenänderungen der Atmungskettenkomplexe und Superkomplexe aus Cerebrum von Fischer-Ratten größtenteils ähnliche Tendenzen zeigten wie sie bereits für Cortex aus Wistar-Ratte nachgewiesen werden konnten<sup>[118]</sup>. Durch eine Kalorienrestriktion wurden altersbedingte Mengenänderungen teilweise kompensiert (Anteil F<sub>1</sub>), allerdings wurden auch Verstärkungen des Alternseffekts detektiert (Komplex I und Superkomplex b). Beim Vergleich der Hirnmitochondrien mit den beiden Mitochondrienspezies aus Herz, die aus denselben Tieren stammen, konnte eine größere Ähnlichkeit zu den subsarcolemmalen Mitochondrien festgestellt werden. Eine Kalorienrestriktion verursachte in beiden Altersstufen sehr deutliche Mengenabnahmen nahezu aller untersuchten Atmungskettenkomplexe und Superkomplexe, wobei diese in der Gruppe der jungen CR-Tiere weitaus deutlicher ausfielen als bei den alten CR-Tieren. Solche hohen Mengenabnahmen beeinflussen vermutlich sehr stark den Energiehaushalt. Das könnte darauf hindeuten, dass der Zeitpunkt des Beginns der Kalorienrestriktion im Alter von 6 Wochen eventuell zu früh ist, da diese noch in der Entwicklungsphase der Tiere erfolgte.

### 6.2.3 Mitochondrien aus Leber

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse des mitochondrialen Proteoms von *Rattus norvegicus* erfolgte an drei verschiedenen Gruppen von Tieren, um sowohl die Effekte des Alterns als auch einer kurzzeitigen Kalorienrestriktion in fortgeschrittenem Alter aufzudecken. Dabei handelte es sich um junge und alte *ad libitum* gefütterte Tiere und eine Gruppe von alten Tieren, die in den letzten beiden Lebensmonaten einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden. Eine Gruppe von jungen Tieren mit Kalorienrestriktion stand nicht zur Verfügung.



---

Von den hier analysierten Leberproben wurden bereits jeweils drei Individuen pro Gruppe von mir in meiner Diplomarbeit<sup>[92]</sup> untersucht. Da bei der Gruppe der jungen Tiere sogar ein Individuum aufgrund einer vermutlich entwickelten pathologischen Störung aussortiert werden musste, wurden Leberproben weiterer Individuen aus derselben Zucht den Gruppen hinzugefügt, um eine höhere Probenanzahl zu erzielen. Um den Zeitaufwand für die Herstellung der 2D-BN/SDS-Gele zu minimieren, wurde für alle drei Gruppen ein Probenpool angelegt. Zuvor wurde ein Vergleich des Bandenprofils in der ersten Dimension (BN-PAGE) durchgeführt, bei dem sich für einige Individuen deutliche Abweichungen zu den anderen Tieren detektieren ließen. Die Proben dieser Tiere wurden für die jungen und alten *ad libitum* gefütterten Tiere beim Anlegen des Probenpools nicht berücksichtigt, sodass die Gruppe der jungen Tiere fünf Individuen und die der alten Tiere sechs Individuen umfasste. Für die Gruppe der alten CR-Tiere standen für die beiden unterschiedlichen Bandenprofile jeweils zwei Proben zur Verfügung. Da nicht bekannt war, welches der beiden Bandenprofile das für diese Gruppe spezifische Profil darstellt, wurden zwei verschiedene Probenpools dieser Gruppe angelegt.

Die Quantifizierung der Atmungskettenkomplexe der ersten OCR-Gruppe, die das im Vergleich mit den anderen Probenpools deutlich abweichende Proteinprofil in den BN-Gelen ausgebildet hat, zeigte hohe Mengenzunahmen der individuellen OxPhos-Komplexe und des kleinsten Superkomplexes III<sub>2</sub>IV im Vergleich mit den *ad libitum* gefütterten alten Tieren (Abbildungen 5.103, 5.104, 5.105, Tabelle 6.6), die aufgrund des gleichen Alters die Referenzgruppe für die CR-Tiere darstellen. Gleichzeitig konnten für die größeren Superkomplexe a bis c sehr deutliche Mengenabnahmen von über 30% detektiert werden (Abbildung 5.107, Tabelle 6.6), was darauf schließen lässt, dass bei den beiden Tieren, die die OCR (1)-Gruppe darstellen, eine Disassemblierung der großen Superkomplexe zum kleineren Superkomplex und zu den individuellen Komplexen stattfindet. Es ist zu vermuten, dass dieser Veränderung entweder eine Instabilität der Superkomplexe, eine gestörte Assemblierung oder die Kombination aus beiden Möglichkeiten zugrunde liegt. Die Gesamtmenge der ATP-Synthase zeigte ebenfalls eine deutliche Mengenabnahme und deutlich veränderte Anteile der Monomere und Dimere. Bei den anderen drei untersuchten Gruppen konnte für das Dimer mit knapp 60% der höchste Anteil aller vier gefundenen Formen (Mono-, Di-, Tri- und Tetramer) an der Gesamtmenge der ATP-Synthase detektiert werden, während in der OCR (1)-Gruppe das Monomer mit 49% die vorherrschende Form darstellte, da für das Dimer nur ein Anteil von 43% ermittelt wurde (Abbildung 5.101). Die detektierten drastischen Änderungen der Proteinmengen von Atmungskettenkomplexen und Superkomplexen verursachen vermutlich Störungen des Energiemetabolismus der Tiere. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass diese Tiere nicht die ‚normale‘ Gruppe

der alten Tiere, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, darstellen. Möglicherweise handelte es sich bei dem Auslöser, der zu dieser deutlichen Veränderung führte, um eine systemische Erkrankung wie Krebs oder das Unvermögen des Metabolismus der Tiere, auf die verminderte Kalorienzufuhr in den letzten zwei Lebensmonaten zu reagieren.

**Tab. 6.6:** Übersicht der in Mitochondrien aus Rattenleber detektierten alterns- und CR-bedingten Veränderungen der Proteinmenge von Atmungskettenkomplexen, Superkomplexen und anderen mitochondrialen Proteinen. (↑ = Zunahme zwischen 10% und 29%, ↑↑ = Zunahme über 30%, ↓ = Abnahme zwischen 10% und 29%, ↓↓ = Abnahme über 30%, — = keine Veränderung bzw. weniger als 10%)

	Veränderung der Proteinmenge		
	alternsbedingt	CR-bedingt	
	OAL/YAL	OCR (1)/OAL	OCR (2)/OAL
Gesamtmenge ATP-Synthase	—	↓↓	—
Monomer/Dimer-Verhältnis	—	↑↑	—
Komplex I	—	↑↑	—
Komplex III <sub>2</sub>	↓	↑↑	—
Komplex IV	↓	↑↑	↑
Superkomplex III <sub>2</sub> IV	↓	↑↑	↑↑
Superkomplex a	↓	↓↓	—
Superkomplex b	—	↓↓	—
Superkomplex c	—	↓↓	↑
Aconitase	↓↓	↓	↑↑
Prohibitin	↑	—	↓

Bei dem Vergleich der anderen drei Gruppen, *ad libitum* gefütterte junge und alte Tiere sowie alte CR-Tiere, zeigte sich bei der Gesamtmenge der ATP-Synthase und bei deren Verteilung auf die von der ATP-Synthase gefundenen Formen Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer keine Veränderungen mit dem Alter oder der Kalorienrestriktion, die einen Wert von über 10% erreichen. Damit ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den subsarcolemmalen Mitochondrien aus Rattenherz, für die eine minimale nicht-signifikante Mengenzunahme der ATP-Synthase von 8% beobachtet werden konnte (Abbildung 5.45), während sich allerdings im Gegensatz zu den Lebermitochondrien in der Altersstufe der 27 Monate alten Tiere eine CR-bedingte Mengenabnahme zeigte. Der Unterschied zwischen den Tieren mit Kalorienrestriktion aus den beiden Experimenten mit Herz / Hirn und Leber besteht allerdings in der Dauer der Kalorienrestriktion. Die Tiere, denen Herz- und Hirngewebe entnommen wurden, bekamen bereits ab dem Alter von 6 Wochen eine reduzierte Kalorienmenge, während die Ratten, aus denen die Leberproben stammten, erst 2 Monate vor ihrem Tod mit der

---

Reduktion der Futtermenge begannen. Daher ist es schwierig einzuordnen, inwieweit dem detektierten Unterschied, der infolge der Kalorienrestriktion bei alten Individuen auftrat, eine gewebespezifische Ursache oder der Einfluss der Dauer der Kalorienrestriktion zugrunde liegt. In spezifischen Hirnarealen der Ratte wie Cortex<sup>[118]</sup> und Cerebrum (Abbildung 5.86), sowie dem Gesamthirn<sup>[104]</sup> konnte eine Verminderung der ATP-Synthase-Menge mit fortschreitendem Alter detektiert werden. Die gleiche Tendenz wurde auch für andere Modellorganismen wie *Podospora anserina*<sup>[105]</sup> und *Caenorhabditis elegans*<sup>[105]</sup> und ebenso für humane Zellen<sup>[177]</sup> nachgewiesen.

Die individuellen Komplexe und die Superkomplexe zeigten entweder keine altersbedingten Änderungen oder Mengenabnahmen, jedoch nie eine Mengenzunahme (Tabelle 6.6). So konnten bei Komplex III<sub>2</sub> (Abbildung 5.104) und Komplex IV (Abbildung 5.105) sowie bei den beiden kleinsten detektierten Superkomplexen III<sub>2</sub>IV und a (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>, Abbildung 5.107) altersbedingte Mengenabnahmen detektiert werden. Eine kurzzeitige Kalorienrestriktion im Alter kann die für Komplex IV und Superkomplex III<sub>2</sub>IV beobachteten altersbedingten Mengenabnahmen teilweise auffangen und für den Superkomplex sogar fast komplett kompensieren, sodass nahezu die gleiche Proteinmenge detektiert werden kann wie in den jungen Ratten. Für Komplex I und die großen Superkomplexe b und c zeigen sich keine altersbedingten Veränderungen und ausschließlich Superkomplex c zeigt eine höhere Proteinmenge bei den CR-Tieren im Vergleich mit der OAL-Gruppe und sogar mit der Gruppe der jungen Tiere. Komplex I ist in vielen Geweben nur zu relativ geringen Teilen als individueller Komplex detektierbar. So beträgt der Anteil des individuellen Komplexes an der Gesamtmenge von Komplex I in Rinderherzmitochondrien etwa 14% bis 16%<sup>[153]</sup>, während für Rattenhirnmitochondrien bereits gezeigt wurde, dass sogar bis zu 95% von Komplex I zu Superkomplexen assoziiert vorliegt<sup>[93, 103]</sup>. Auch für die in meiner Arbeit untersuchten subsarcolemmalen Mitochondrien aus Herzmuskel konnte ein maximaler Anteil von 11% für den individuellen Komplex I beobachtet werden (Abbildung 5.63). Die Lebermitochondrien zeigten im Gegensatz dazu einen sehr hohen Anteil an individuellem Komplex I von um die 40% für die Gruppen YAL, OAL und OCR (2) (Abbildung 5.108). Damit ist er zusammen mit Superkomplex a, der sehr ähnliche Werte des Anteils an der Gesamtmenge aufwies, die häufigste Art, in der Komplex I in Mitochondrien aus Rattenleber beobachtet werden konnte. Dani *et al.*<sup>[55]</sup> wiesen mittels DIGE-Analyse nach, dass sich je zwei Untereinheiten von Komplex I und Komplex IV in Mitochondrien aus Rattenleber mit Alter und Kalorienrestriktion verändern. Eine der beiden Untereinheiten von Komplex I mit einer Masse von 40,8 kDa zeigte mit dem Alter keine Änderung der Proteinmenge, während sich diese aufgrund einer Kalorienrestriktion leicht verminderte. Für die andere Untereinheit mit einer Masse von

---

17,2 kDa konnte eine altersbedingte Zunahme detektiert werden, die durch die Kalorienrestriktion unabhängig vom Alter kompensiert wurde. Für die beiden detektierten Untereinheiten von Komplex IV ergaben sich altersabhängige Mengenzunahmen von 45%, die ebenfalls durch die Kalorienrestriktion sowohl bei jungen als auch bei alten Tieren teilweise bzw. komplett umgekehrt werden konnten<sup>[55]</sup>. Für den in meiner Arbeit untersuchten individuellen Komplex I aus Lebermitochondrien konnte keine Veränderung mit dem Alter oder der Kalorienrestriktion detektiert werden (Abbildung 5.103). Komplex IV zeigte im Gegensatz zu Dani *et al.*<sup>[55]</sup> einen altersabhängigen Rückgang der Proteinmenge, der allerdings ebenso von der Kalorienrestriktion teilweise kompensiert wurde (Abbildung 5.105).

Für die Aconitase wurde in den hier untersuchten Lebermitochondrien eine deutliche altersbedingte Mengenabnahme von 42% beobachtet. Die kurzzeitige Kalorienrestriktion im Alter verursacht eine Erhöhung der Proteinmenge im Vergleich zu den alten Tieren, die *ad libitum* gefüttert wurden, allerdings erfolgte keine komplette Kompensation des Alternseffektes. Die Proteinmenge der OCR (2)-Gruppe lag nach wie vor unter der der YAL-Gruppe. Dass für die Lebermitochondrien altersbedingte Veränderungen der Proteinmenge der Aconitase detektiert werden konnten, ist ein unerwartetes Ergebnis. Es konnte schon mehrfach in anderen Geweben der Ratte und anderen Organismen nachgewiesen werden, dass die Aconitase keinen Mengenänderungen infolge des Alterns unterworfen ist. Aufgrund dessen wird die Aconitase als ein „housekeeping“-Protein angesehen. Einzig im Hirnareal Hippocampus wurde bisher eine altersbedingte Veränderung der Aconitasemenge beobachtet<sup>[30]</sup>. Sowohl in Rattenhirn, als auch in anderen Organismen wie dem filamentösen Pilz *Podospora anserina*, Insekten und humanen Zellen konnten keine altersabhängigen Änderungen der Enzymmenge festgestellt werden<sup>[103, 177, 190]</sup>. Die bisher detektierten Alternerscheinungen der Aconitase spiegeln sich nur in einer verminderten Aktivität des Enzyms durch posttranslationale Modifikation wider, was in verschiedenen Geweben von Säugern und in Insekten nachgewiesen werden konnte<sup>[190-192]</sup>.

Bei Prohibitin handelt es sich um ein membranständiges Protein, das in der inneren Mitochondrienmembran zu großen ringförmigen Prohibitinkomplexen assoziiert mit einer Masse von über 1 MDa vorliegt<sup>[169]</sup>. Es wird vermutet, dass das Protein eine Vielzahl an Funktionen in den Mitochondrien und der Zelle übernimmt, von denen allerdings noch nicht alle bewiesen werden konnten. So wird vermutet, dass Prohibitin ein Chaperon für Atmungskettenkomplexe darstellt oder als eine Art Gerüst in der Membran für die korrekte Funktion und Morphologie der Mitochondrien verantwortlich ist. Es wurde gezeigt, dass Prohibitine auf mitochondrialen Stress reagieren<sup>[193]</sup> und für die Proliferation von Tumorzellen notwendig sind<sup>[194]</sup>. Die in meiner Arbeit untersuchten Lebermitochondrien zeigten eine alters-

---

abhängige Zunahme der Prohibitinmenge um 21%. Aufgrund der kurzzeitigen Kalorienrestriktion in fortgeschrittenem Alter wurde für die OCR (2)-Gruppe eine partielle Kompensation des Alternseffekts beobachtet. Chang *et al.*<sup>[195]</sup> wiesen ebenfalls eine Erhöhung der Prohibitinmenge mit dem Alter in Rattenleber nach, allerdings betrug die detektierte Zunahme 83%. Eine lebenslange Kalorienrestriktion konnte die starke Zunahme allerdings nicht kompensieren, die Menge an Prohibitin blieb unabhängig von der Kalorienaufnahme im Alter konstant erhöht.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in den hier untersuchten Lebermitochondrien altersbedingte Mengenabnahmen sowohl von individuellen Atmungskettenkomplexen als auch von Superkomplexen detektiert wurden, von denen etwa die Hälfte durch eine kurzzeitige Kalorienrestriktion in fortgeschrittenem Alter zumindest teilweise kompensiert werden konnte (OCR (2)-Gruppe). Dies ist konsistent mit den Ergebnissen von Cao *et al.*<sup>[51]</sup>, die in der Leber von Mäusen bereits durch eine vierwöchige Kalorienrestriktion eine Umkehrung der meisten altersbedingten Veränderungen auf Proteinebene beobachten konnten. Die ATP-Synthase zeigte keine Veränderung mit dem Alter oder mit Kalorienrestriktion. Für die OCR (1)-Gruppe wurden sehr deutliche Mengenabnahmen der Superkomplexe detektiert, während für die individuellen Komplexe Zunahmen zu verzeichnen waren. Dies deutet auf eine Disassemblierung der hochmolekularen Strukturen hin.

---

## 7 Abkürzungsverzeichnis

---

Ø	Durchschnitt
1D	erste Dimension
2D	zweite Dimension
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B	Breite
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BHM	Rinderherzmitochondrien ( von engl. <i>bovine heart mitochondria</i> )
BN	blau-nativ
BSA	Rinderserumalbumin (von engl. <i>bovine serum albumin</i> )
C	Vernetzungsgrad (von engl. <i>crosslinker concentration</i> )
COX	Cytochrom-c-Oxidase, Komplex IV der oxidativen Phosphorylierung
CR	Kalorienrestriktion (von engl. <i>calorie restriction</i> )
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	2,4-Dinitrophenylhydrazon
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-tetraacetat
ECL	engl. <i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung ( $1\text{ g} = 9,81\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$ )
GU	Grauwerteinheiten (von engl. <i>grey units</i> )
H	Höhe
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HMW	Proteinstandard für einen hohen Massebereich (von engl. <i>high molecular weight</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase (von engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
HSP	Hitzeschockprotein
kDa	kilo Dalton
LMW	Proteinstandard für einen niedrigen Massebereich (von engl. <i>low molecular weight</i> )
MDa	mega Dalton

---

MilliQ	gereinigtes destilliertes VE-Wasser, frei von Partikeln > 0,22 µm
min.	Minute(n)
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OAL	alte Individuen, mit unbeschränkter Futteraufnahme (von engl. <i>old ad libitum</i> )
OCR	alte Individuen, mit Kalorienrestriktion (von engl. <i>old calorie restriction</i> )
OD	optische Dichte
OSCP	engl. <i>oligomycin sensitivity conferral protein</i>
OxPhos	Oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p-Wert	Signifikanzwert (von engl. <i>probability value</i> )
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (von engl. <i>reactive nitrogen species</i> )
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (von engl. <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (von engl. <i>revolutions per minute</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat (von engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SOD	Superoxiddismutase
T	Totalacrylamidkonzentration
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tricin	N-[Tri-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheit
(v/v)	Volumen pro Gesamtvolumen (von engl. <i>volume per volume</i> )
(w/v)	Gewicht pro Gesamtvolumen (von engl. <i>weight per volume</i> )
VE	vollentsalzt
YAL	junge Individuen, mit unbeschränkter Futteraufnahme (von engl. <i>young ad libitum</i> )
YCR	junge Individuen, mit Kalorienrestriktion (von engl. <i>young calorie restriction</i> )

---

## 8 Literaturverzeichnis

---

- [1] Vina, J., Borras, C. & Miquel, J. (2007), "*Theories of ageing.*" IUBMB Life, **59**(4-5): p. 249-54.
- [2] Benzi, G., Pastoris, O., Dossena, M., Marzatico, F., Villa, R.F. & Dagani, F. (1990), "*Factors involved in the age-related alteration in the efficiency of the brain bioenergetics.*" Mech Ageing Dev, **56**(2): p. 155-68.
- [3] Lakatta, E.G. & Yin, F.C. (1982), "*Myocardial aging: functional alterations and related cellular mechanisms.*" Am J Physiol, **242**(6): p. H927-41.
- [4] Harman, D. (1956), "*Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.*" J Gerontol, **11**(3): p. 298-300.
- [5] Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. (1979), "*Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.*" Physiol Rev, **59**(3): p. 527-605.
- [6] Loeb, L.A., Wallace, D.C. & Martin, G.M. (2005), "*The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations.*" Proc Natl Acad Sci U S A, **102**(52): p. 18769-70.
- [7] Aquilano, K., Vigilanza, P., Rotilio, G. & Ciriolo, M.R. (2006), "*Mitochondrial damage due to SOD1 deficiency in SH-SY5Y neuroblastoma cells: a rationale for the redundancy of SOD1.*" FASEB J, **20**(10): p. 1683-5.
- [8] Endlicher, R., Krivakova, P., Rauchova, H., Nuskova, H., Cervinkova, Z. & Drahota, Z. (2009), "*Peroxidative damage of mitochondrial respiration is substrate-dependent.*" Physiol Res, **58**(5): p. 685-92.
- [9] Turrens, J.F. (2003), "*Mitochondrial formation of reactive oxygen species.*" J Physiol, **552**(Pt 2): p. 335-44.
- [10] Boveris, A., Oshino, N. & Chance, B. (1972), "*The cellular production of hydrogen peroxide.*" Biochem J, **128**(3): p. 617-30.
- [11] Linnane, A.W., Marzuki, S., Ozawa, T. & Tanaka, M. (1989), "*Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases.*" Lancet, **1**(8639): p. 642-5.
- [12] Gadaleta, M.N., Petruzzella, V., Renis, M., Fracasso, F. & Cantatore, P. (1990), "*Reduced transcription of mitochondrial DNA in the senescent rat. Tissue dependence and effect of L-carnitine.*" Eur J Biochem, **187**(3): p. 501-6.
- [13] Mohamed, S.A., Hanke, T., Erasmi, A.W., Bechtel, M.J., Scharfschwerdt, M., Meissner, C., Sievers, H.H. & Gossiau, A. (2006), "*Mitochondrial DNA deletions and the aging heart.*" Exp Gerontol, **41**(5): p. 508-17.
- [14] Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly, Y.M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., Tornell, J., Jacobs, H.T. & Larsson, N.G. (2004), "*Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase.*" Nature, **429**(6990): p. 417-23.
- [15] Hoch, F.L. (1992), "*Cardiolipins and biomembrane function.*" Biochim Biophys Acta, **1113**(1): p. 71-133.
- [16] Leeuwenburgh, C., Wagner, P., Holloszy, J.O., Sohal, R.S. & Heinecke, J.W. (1997), "*Caloric restriction attenuates dityrosine cross-linking of cardiac and skeletal muscle proteins in aging mice.*" Arch Biochem Biophys, **346**(1): p. 74-80.
- [17] Kanski, J. & Schoneich, C. (2005), "*Protein nitration in biological aging: proteomic and tandem mass spectrometric characterization of nitrated sites.*" Methods Enzymol, **396**: p. 160-71.



- 
- [18] Choksi, K.B., Nuss, J.E., Deford, J.H. & Papaconstantinou, J. (2008), "*Age-related alterations in oxidatively damaged proteins of mouse skeletal muscle mitochondrial electron transport chain complexes.*" *Free Radic Biol Med*, **45**(6): p. 826-38.
- [19] DiMauro, S. (2004), "*Mitochondrial diseases.*" *Biochim Biophys Acta*, **1658**(1-2): p. 80-8.
- [20] Guerrieri, F., Vendemiale, G., Turturro, N., Fratello, A., Furio, A., Muolo, L., Grattagliano, I. & Papa, S. (1996), "*Alteration of mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase during aging. Possible involvement of oxygen free radicals.*" *Ann N Y Acad Sci*, **786**: p. 62-71.
- [21] Nohl, H. & Kramer, R. (1980), "*Molecular basis of age-dependent changes in the activity of adenine nucleotide translocase.*" *Mech Ageing Dev*, **14**(1-2): p. 137-44.
- [22] Hansford, R.G. (1983), "*Bioenergetics in aging.*" *Biochim Biophys Acta*, **726**(1): p. 41-80.
- [23] Paradies, G. & Ruggiero, F.M. (1990), "*Age-related changes in the activity of the pyruvate carrier and in the lipid composition in rat-heart mitochondria.*" *Biochim Biophys Acta*, **1016**(2): p. 207-12.
- [24] Paradies, G., Ruggiero, F.M., Gadaleta, M.N. & Quagliariello, E. (1992), "*The effect of aging and acetyl-L-carnitine on the activity of the phosphate carrier and on the phospholipid composition in rat heart mitochondria.*" *Biochim Biophys Acta*, **1103**(2): p. 324-6.
- [25] Sugawa, M., Coper, H., Schulze, G., Yamashina, I., Krause, F. & Dencher, N.A. (1996), "*Impaired plasticity of neurons in aging. Biochemical, biophysical, and behavioral studies.*" *Ann N Y Acad Sci*, **786**: p. 274-82.
- [26] Kwong, L.K. & Sohal, R.S. (2000), "*Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse.*" *Arch Biochem Biophys*, **373**(1): p. 16-22.
- [27] Hagen, T.M., Yowe, D.L., Bartholomew, J.C., Wehr, C.M., Do, K.L., Park, J.Y. & Ames, B.N. (1997), "*Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase.*" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(7): p. 3064-9.
- [28] Paradies, G., Ruggiero, F.M., Petrosillo, G. & Quagliariello, E. (1996), "*Age-dependent impairment of mitochondrial function in rat heart tissue. Effect of pharmacological agents.*" *Ann N Y Acad Sci*, **786**: p. 252-63.
- [29] Toescu, E.C., Myronova, N. & Verkhatsky, A. (2000), "*Age-related structural and functional changes of brain mitochondria.*" *Cell Calcium*, **28**(5-6): p. 329-38.
- [30] Frenzel, M. (2011), "*Mitochondrial ageing in rat brain areas and human fibroblasts*", Dissertation, Technische Universität Darmstadt
- [31] Hütter, E., Skovbro, M., Lener, B., Prats, C., Rabol, R., Dela, F. & Jansen-Dürr, P. (2007), "*Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle.*" *Aging Cell*, **6**(2): p. 245-56.
- [32] Drachman, D.A. (2007), "*Rethinking Alzheimer's disease: the role of age-related changes.*" *Curr Neurol Neurosci Rep*, **7**(4): p. 265-8.
- [33] Finkel, T., Serrano, M. & Blasco, M.A. (2007), "*The common biology of cancer and ageing.*" *Nature*, **448**(7155): p. 767-74.
- [34] Prabakaran, S., Swatton, J.E., Ryan, M.M., Huffaker, S.J., Huang, J.T., Griffin, J.L., Wayland, M., Freeman, T., Dudbridge, F., Lilley, K.S., Karp, N.A., Hester, S., Tkachev, D., Mimmack, M.L., Yolken, R.H., Webster, M.J., Torrey, E.F. & Bahn, S. (2004), "*Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress.*" *Mol Psychiatry*, **9**(7): p. 684-97, 643.
- [35] McCay, C.M., Crowell, M.F. & Maynard, L.A. (1989), "*The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935.*" *Nutrition*, **5**(3): p. 155-71; discussion 172.

- 
- [36] Lin, S.J., Defossez, P.A. & Guarente, L. (2000), "*Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae.*" *Science*, **289**(5487): p. 2126-8.
- [37] Jiang, J.C., Jaruga, E., Repnevskaya, M.V. & Jazwinski, S.M. (2000), "*An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast.*" *FASEB J*, **14**(14): p. 2135-7.
- [38] Houthoofd, K., Braeckman, B.P., Lenaerts, I., Brys, K., De Vreese, A., Van Eygen, S. & Vanfleteren, J.R. (2002), "*Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in Caenorhabditis elegans.*" *Exp Gerontol*, **37**(12): p. 1371-8.
- [39] Weindruch, R. & Walford, R.L. (1982), "*Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence.*" *Science*, **215**(4538): p. 1415-8.
- [40] Weindruch, R., Walford, R.L., Fligiel, S. & Guthrie, D. (1986), "*The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake.*" *J Nutr*, **116**(4): p. 641-54.
- [41] Yu, B.P., Masoro, E.J. & McMahan, C.A. (1985), "*Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics.*" *J Gerontol*, **40**(6): p. 657-70.
- [42] Lane, M.A., Mattison, J.A., Roth, G.S., Brant, L.J. & Ingram, D.K. (2004), "*Effects of long-term diet restriction on aging and longevity in primates remain uncertain.*" *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **59**(5): p. 405-7.
- [43] Messaoudi, I., Warner, J., Fischer, M., Park, B., Hill, B., Mattison, J., Lane, M.A., Roth, G.S., Ingram, D.K., Picker, L.J., Douek, D.C., Mori, M. & Nikolich-Zugich, J. (2006), "*Delay of T cell senescence by caloric restriction in aged long-lived nonhuman primates.*" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(51): p. 19448-53.
- [44] Colman, R.J., Beasley, T.M., Allison, D.B. & Weindruch, R. (2008), "*Attenuation of sarcopenia by dietary restriction in rhesus monkeys.*" *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **63**(6): p. 556-9.
- [45] Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., Kastman, E.K., Kosmatka, K.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Cruzen, C., Simmons, H.A., Kemnitz, J.W. & Weindruch, R. (2009), "*Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys.*" *Science*, **325**(5937): p. 201-4.
- [46] Lane, M.A., Baer, D.J., Rumpler, W.V., Weindruch, R., Ingram, D.K., Tilmont, E.M., Cutler, R.G. & Roth, G.S. (1996), "*Calorie restriction lowers body temperature in rhesus monkeys, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents.*" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(9): p. 4159-64.
- [47] Colman, R.J., Roecker, E.B., Ramsey, J.J. & Kemnitz, J.W. (1998), "*The effect of dietary restriction on body composition in adult male and female rhesus macaques.*" *Aging (Milano)*, **10**(2): p. 83-92.
- [48] Kemnitz, J.W., Roecker, E.B., Weindruch, R., Elson, D.F., Baum, S.T. & Bergman, R.N. (1994), "*Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys.*" *Am J Physiol*, **266**(4 Pt 1): p. E540-7.
- [49] Mattison, J.A., Roth, G.S., Beasley, T.M., Tilmont, E.M., Handy, A.M., Herbert, R.L., Longo, D.L., Allison, D.B., Young, J.E., Bryant, M., Barnard, D., Ward, W.F., Qi, W., Ingram, D.K. & de Cabo, R. (2012), "*Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study.*" *Nature*, **489**(7415): p. 318-21.
- [50] Lee, C.K., Klopp, R.G., Weindruch, R. & Prolla, T.A. (1999), "*Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction.*" *Science*, **285**(5432): p. 1390-3.
- [51] Cao, S.X., Dhahbi, J.M., Mote, P.L. & Spindler, S.R. (2001), "*Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice.*" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(19): p. 10630-5.

- 
- [52] Feuers, R.J. (1998), "*The effects of dietary restriction on mitochondrial dysfunction in aging.*" Ann N Y Acad Sci, **854**: p. 192-201.
- [53] Bevilacqua, L., Ramsey, J.J., Hagopian, K., Weindruch, R. & Harper, M.E. (2004), "*Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production.*" Am J Physiol Endocrinol Metab, **286**(5): p. E852-61.
- [54] Hagopian, K., Harper, M.E., Ram, J.J., Humble, S.J., Weindruch, R. & Ramsey, J.J. (2005), "*Long-term calorie restriction reduces proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria.*" Am J Physiol Endocrinol Metab, **288**(4): p. E674-84.
- [55] Dani, D., Shimokawa, I., Komatsu, T., Higami, Y., Warnken, U., Schokraie, E., Schnolzer, M., Krause, F., Sugawa, M.D. & Dencher, N.A. (2010), "*Modulation of oxidative phosphorylation machinery signifies a prime mode of anti-ageing mechanism of calorie restriction in male rat liver mitochondria.*" Biogerontology, **11**(3): p. 321-34.
- [56] Anderson, R.M. & Weindruch, R. (2010), "*Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging.*" Trends Endocrinol Metab, **21**(3): p. 134-41.
- [57] Higami, Y., Pugh, T.D., Page, G.P., Allison, D.B., Prolla, T.A. & Weindruch, R. (2004), "*Adipose tissue energy metabolism: altered gene expression profile of mice subjected to long-term caloric restriction.*" FASEB J, **18**(2): p. 415-7.
- [58] Higami, Y., Barger, J.L., Page, G.P., Allison, D.B., Smith, S.R., Prolla, T.A. & Weindruch, R. (2006), "*Energy restriction lowers the expression of genes linked to inflammation, the cytoskeleton, the extracellular matrix, and angiogenesis in mouse adipose tissue.*" J Nutr, **136**(2): p. 343-52.
- [59] Sauve, A.A., Wolberger, C., Schramm, V.L. & Boeke, J.D. (2006), "*The biochemistry of sirtuins.*" Annu Rev Biochem, **75**: p. 435-65.
- [60] Cohen, H.Y., Miller, C., Bitterman, K.J., Wall, N.R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K.T., Gorospe, M., de Cabo, R. & Sinclair, D.A. (2004), "*Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase.*" Science, **305**(5682): p. 390-2.
- [61] Chen, D., Bruno, J., Easlon, E., Lin, S.J., Cheng, H.L., Alt, F.W. & Guarente, L. (2008), "*Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction.*" Genes Dev, **22**(13): p. 1753-7.
- [62] Vaziri, H., Dessain, S.K., Ng Eaton, E., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L. & Weinberg, R.A. (2001), "*hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase.*" Cell, **107**(2): p. 149-59.
- [63] Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L. & Gu, W. (2001), "*Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress.*" Cell, **107**(2): p. 137-48.
- [64] van der Horst, A. & Burgering, B.M. (2007), "*Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease.*" Nat Rev Mol Cell Biol, **8**(6): p. 440-50.
- [65] Kagawa, Y. (1978), "*Impact of Westernization on the nutrition of Japanese: changes in physique, cancer, longevity and centenarians.*" Prev Med, **7**(2): p. 205-17.
- [66] Todoriki, H., Willcox, D.C. & Willcox, B.J. (2004), "*The Effects of Post-War Dietary change on longevity and health in Okinawa.*" Oki J Amer Studies, (1): p. 55-64.
- [67] Forster, M.J., Morris, P. & Sohal, R.S. (2003), "*Genotype and age influence the effect of caloric intake on mortality in mice.*" FASEB J, **17**(6): p. 690-2.
- [68] Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M. & Sinclair, D. (2004), "*Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans.*" Nature, **430**(7000): p. 686-9.

- 
- [69] Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poosala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Le Couteur, D., Shaw, R.J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D.K., de Cabo, R. & Sinclair, D.A. (2006), "*Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet.*" *Nature*, **444**(7117): p. 337-42.
- [70] Pearson, K.J., Baur, J.A., Lewis, K.N., Peshkin, L., Price, N.L., Labinskyy, N., Swindell, W.R., Kamara, D., Minor, R.K., Perez, E., Jamieson, H.A., Zhang, Y., Dunn, S.R., Sharma, K., Pleshko, N., Woollett, L.A., Csiszar, A., Ikeno, Y., Le Couteur, D., Elliott, P.J., Becker, K.G., Navas, P., Ingram, D.K., Wolf, N.S., Ungvari, Z., Sinclair, D.A. & de Cabo, R. (2008), "*Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span.*" *Cell Metab*, **8**(2): p. 157-68.
- [71] Bass, T.M., Weinkove, D., Houthoofd, K., Gems, D. & Partridge, L. (2007), "*Effects of resveratrol on lifespan in Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans.*" *Mech Ageing Dev*, **128**(10): p. 546-52.
- [72] Zarse, K., Schmeisser, S., Birringer, M., Falk, E., Schmoll, D. & Ristow, M. (2010), "*Differential effects of resveratrol and SRT1720 on lifespan of adult Caenorhabditis elegans.*" *Horm Metab Res*, **42**(12): p. 837-9.
- [73] Kaeberlein, M. & Powers, R.W., 3rd (2007), "*Sir2 and calorie restriction in yeast: a skeptical perspective.*" *Ageing Res Rev*, **6**(2): p. 128-40.
- [74] Kunsch, K. & Kunsch, S., "*Der Mensch in Zahlen.*" 2. Auflage, 2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [75] Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., Jovinge, S. & Frisen, J. (2009), "*Evidence for cardiomyocyte renewal in humans.*" *Science*, **324**(5923): p. 98-102.
- [76] Palmer, J.W., Tandler, B. & Hoppel, C.L. (1977), "*Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle.*" *J Biol Chem*, **252**(23): p. 8731-9.
- [77] Schwartz, A. (1971), "*Electron transport and mitochondria.*" *Cardiology*, **56**(1): p. 35-42.
- [78] Hoppeler, H., Lindstedt, S.L., Claassen, H., Taylor, C.R., Mathieu, O. & Weibel, E.R. (1984), "*Scaling mitochondrial volume in heart to body mass.*" *Respir Physiol*, **55**(2): p. 131-7.
- [79] Lesnefsky, E.J., Gudiz, T.I., Moghaddas, S., Migita, C.T., Ikeda-Saito, M., Turkaly, P.J. & Hoppel, C.L. (2001), "*Aging decreases electron transport complex III activity in heart interfibrillar mitochondria by alteration of the cytochrome c binding site.*" *J Mol Cell Cardiol*, **33**(1): p. 37-47.
- [80] Rosca, M.G., Vazquez, E.J., Kerner, J., Parland, W., Chandler, M.P., Stanley, W., Sabbah, H.N. & Hoppel, C.L. (2008), "*Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation.*" *Cardiovasc Res*, **80**(1): p. 30-9.
- [81] <http://www.hsc.wvu.edu/ccrs/investigators/hollander.asp>, Stand: 10.02.2013
- [82] Ferreira, R., Vitorino, R., Alves, R.M., Appell, H.J., Powers, S.K., Duarte, J.A. & Amado, F. (2010), "*Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle.*" *Proteomics*, **10**(17): p. 3142-54.
- [83] McMillin-Wood, J., Wolkowicz, P.E., Chu, A., Tate, C.A., Goldstein, M.A. & Entman, M.L. (1980), "*Calcium uptake by two preparations of mitochondria from heart.*" *Biochim Biophys Acta*, **591**(2): p. 251-65.
- [84] Weinstein, E.S., Benson, D.W. & Fry, D.E. (1986), "*Subpopulations of human heart mitochondria.*" *J Surg Res*, **40**(5): p. 495-8.



- 
- [85] Neely, J.R. & Morgan, H.E. (1974), "*Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle.*" *Annu Rev Physiol*, **36**: p. 413-59.
- [86] Harris, D.A. & Das, A.M. (1991), "*Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart.*" *Biochem J*, **280 ( Pt 3)**: p. 561-73.
- [87] Balaban, R.S. (1990), "*Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell.*" *Am J Physiol*, **258**(3 Pt 1): p. C377-89.
- [88] Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K. & Eppenberger, H.M. (1992), "*Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis.*" *Biochem J*, **281 ( Pt 1)**: p. 21-40.
- [89] Depre, C. & Taegtmeyer, H. (2000), "*Metabolic aspects of programmed cell survival and cell death in the heart.*" *Cardiovasc Res*, **45**(3): p. 538-48.
- [90] Fannin, S.W., Lesnefsky, E.J., Slabe, T.J., Hassan, M.O. & Hoppel, C.L. (1999), "*Aging selectively decreases oxidative capacity in rat heart interfibrillar mitochondria.*" *Arch Biochem Biophys*, **372**(2): p. 399-407.
- [91] Söhn, M. (2010), "*Der Einfluss von Altern und Kalorienreduktion auf das mitochondriale Proteom des Rattenhirns*", Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt
- [92] Thilmany, S. (2008), "*Effekte des Alterns und der kurzzeitigen Kalorienrestriktion auf das mitochondriale Proteom der Rattenleber*", Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt
- [93] Reifschneider, N. (2006), "*Elektrophoretische und massenspektrometrische Analyse des mitochondrialen Proteoms von Eukaryonten*", Dissertation, Technische Universität Darmstadt
- [94] Bradford, M.M. (1976), "*A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.*" *Anal Biochem*, **72**: p. 248-54.
- [95] Laemmli, U.K. (1970), "*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*" *Nature*, **227**(5259): p. 680-5.
- [96] Schägger, H. & von Jagow, G. (1991), "*Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form.*" *Anal Biochem*, **199**(2): p. 223-31.
- [97] Miller, I., Crawford, J. & Gianazza, E. (2006), "*Protein stains for proteomic applications: which, when, why?*" *Proteomics*, **6**(20): p. 5385-408.
- [98] Berggren, K., Chernokalskaya, E., Steinberg, T.H., Kemper, C., Lopez, M.F., Diwu, Z., Haugland, R.P. & Patton, W.F. (2000), "*Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex.*" *Electrophoresis*, **21**(12): p. 2509-21.
- [99] Patton, W.F. (2000), "*A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics.*" *Electrophoresis*, **21**(6): p. 1123-44.
- [100] Blum, H., Beier, H. & Gross, H.J. (1987), "*Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.*" *Electrophoresis*, **8**: p. 93-99.
- [101] Grandier-Vazeille, X. & Guerin, M. (1996), "*Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes.*" *Anal Biochem*, **242**(2): p. 248-54.
- [102] Wittig, I., Carrozzo, R., Santorelli, F.M. & Schagger, H. (2007), "*Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines.*" *Electrophoresis*, **28**(21): p. 3811-20.

- 
- [103] Frenzel, M. (2006), "*Altersabhängige Untersuchung des Proteoms von Rattus norvegicus*", Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt
- [104] Schäfer, E.R. (2007), "*Vergleich des mitochondrialen Rattenhirnproteoms verschiedener Altersstufen mit 2D-Gelelektrophorese und MALDI-Massenspektrometrie*", Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt
- [105] Schäfer, E.R. (2011), "*Massenspektrometrische und gelelektrophoretische Analyse altersabhängiger Veränderungen des mitochondrialen Proteoms von Modellorganismen*", Dissertation, Technische Universität Darmstadt
- [106] Brewer, G.J., Jones, T.T., Wallimann, T. & Schlattner, U. (2004), "*Higher respiratory rates and improved creatine stimulation in brain mitochondria isolated with anti-oxidants.*" *Mitochondrion*, **4**(1): p. 49-57.
- [107] [http://www.brainbits.co.uk/SCAVEGR\\_B24UN7.aspx](http://www.brainbits.co.uk/SCAVEGR_B24UN7.aspx), Stand: 06.07.2012
- [108] <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/enzyme-reagents/proteases.html>, Stand: 07.11.12
- [109] Wilson, E.J. (1987), "*Should nagarse be used during the isolation of brain mitochondria?*" *Neurochem Res*, **12**(9): p. 831-4.
- [110] Reifschneider, N.H., Goto, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Sugawa, M., Dencher, N.A. & Krause, F. (2006), "*Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE.*" *J Proteome Res*, **5**(5): p. 1117-32.
- [111] Wilcoxon, F. (1946), "*Individual comparisons of grouped data by ranking methods.*" *J Econ Entomol*, **39**: p. 269.
- [112] Mann, H.B. & Whitney, D.R. (1947), "*On a test of whether one of 2 random variables is stochastically larger than the other.*" *Annals of Mathematical Statistics*, **18**(1): p. 50-60.
- [113] Schägger, H. & Pfeiffer, K. (2000), "*Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria.*" *EMBO J*, **19**(8): p. 1777-83.
- [114] Krause, F., Reifschneider, N.H., Goto, S. & Dencher, N.A. (2005), "*Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria.*" *Biochem Biophys Res Commun*, **329**(2): p. 583-90.
- [115] Dudkina, N.V., Heinemeyer, J., Keegstra, W., Boekema, E.J. & Braun, H.P. (2005), "*Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane.*" *FEBS Lett*, **579**(25): p. 5769-72.
- [116] Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S. & Braun, H.P. (2004), "*Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria.*" *Plant Physiol Biochem*, **42**(12): p. 937-42.
- [117] Giraud, M.F., Paumard, P., Soubannier, V., Vaillier, J., Arselin, G., Salin, B., Schaeffer, J., Brethes, D., di Rago, J.P. & Velours, J. (2002), "*Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae?*" *Biochim Biophys Acta*, **1555**(1-3): p. 174-80.
- [118] Frenzel, M., Rommelspacher, H., Sugawa, M.D. & Dencher, N.A. (2010), "*Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex.*" *Exp Gerontol*, **45**(7-8): p. 563-72.
- [119] Schultz, B.E. & Chan, S.I. (2001), "*Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes.*" *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **30**: p. 23-65.
- [120] Fearnley, I.M. & Walker, J.E. (1992), "*Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins.*" *Biochim Biophys Acta*, **1140**(2): p. 105-34.

- 
- [121] Brandt, U., Kerscher, S., Drose, S., Zwicker, K. & Zickermann, V. (2003), "*Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism?*" FEBS Lett, **545**(1): p. 9-17.
- [122] Carroll, J., Fearnley, I.M., Shannon, R.J., Hirst, J. & Walker, J.E. (2003), "*Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria.*" Mol Cell Proteomics, **2**(2): p. 117-26.
- [123] Chomyn, A., Mariottini, P., Cleeter, M.W., Ragan, C.I., Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y., Doolittle, R.F. & Attardi, G. (1985), "*Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase.*" Nature, **314**(6012): p. 592-7.
- [124] Chomyn, A., Cleeter, M.W., Ragan, C.I., Riley, M., Doolittle, R.F. & Attardi, G. (1986), "*URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit.*" Science, **234**(4776): p. 614-8.
- [125] Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M. & Rao, Z. (2005), "*Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II.*" Cell, **121**(7): p. 1043-57.
- [126] Hagerhall, C. (1997), "*Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme.*" Biochim Biophys Acta, **1320**(2): p. 107-41.
- [127] Crofts, A.R. (2004), "*The cytochrome bc<sub>1</sub> complex: function in the context of structure.*" Annu Rev Physiol, **66**: p. 689-733.
- [128] Vazquez-Acevedo, M., Antaramian, A., Corona, N. & Gonzalez-Halphen, D. (1993), "*Subunit structures of purified beef mitochondrial cytochrome bc<sub>1</sub> complex from liver and heart.*" J Bioenerg Biomembr, **25**(4): p. 401-10.
- [129] Barja, G. (1999), "*Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity.*" J Bioenerg Biomembr, **31**(4): p. 347-66.
- [130] Fariss, M.W., Chan, C.B., Patel, M., Van Houten, B. & Orrenius, S. (2005), "*Role of mitochondria in toxic oxidative stress.*" Mol Interv, **5**(2): p. 94-111.
- [131] Beckman, J.S. & Koppenol, W.H. (1996), "*Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.*" Am J Physiol, **271**(5 Pt 1): p. C1424-37.
- [132] Nemoto, S., Takeda, K., Yu, Z.X., Ferrans, V.J. & Finkel, T. (2000), "*Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism.*" Mol Cell Biol, **20**(19): p. 7311-8.
- [133] Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W. & Sheu, S.S. (2004), "*Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle.*" Am J Physiol Cell Physiol, **287**(4): p. C817-33.
- [134] Kishida, K.T. & Klann, E. (2007), "*Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory.*" Antioxid Redox Signal, **9**(2): p. 233-44.
- [135] Kadenbach, B., Jarausch, J., Hartmann, R. & Merle, P. (1983), "*Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure.*" Anal Biochem, **129**(2): p. 517-21.
- [136] Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M.J., Libeu, C.P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T. & Tsukihara, T. (1998), "*Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase.*" Science, **280**(5370): p. 1723-9.
- [137] Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1996), "*The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å.*" Science, **272**(5265): p. 1136-44.
- [138] Vonck, J. & Schafer, E. (2009), "*Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane.*" Biochim Biophys Acta, **1793**(1): p. 117-24.

- 
- [139] Chance, B. & Williams, G.R. (1955), "A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation." *Nature*, **176**(4475): p. 250-4.
- [140] Hatefi, Y., Haavik, A.G., Fowler, L.R. & Griffiths, D.E. (1962), "Studies on the electron transfer system. XLII. Reconstitution of the electron transfer system." *J Biol Chem*, **237**: p. 2661-9.
- [141] Hackenbrock, C.R., Chazotte, B. & Gupte, S.S. (1986), "The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport." *J Bioenerg Biomembr*, **18**(5): p. 331-68.
- [142] Berry, E.A. & Trumpower, B.L. (1985), "Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc1 and cytochrome c-aa3 complexes." *J Biol Chem*, **260**(4): p. 2458-67.
- [143] Sone, N., Sekimachi, M. & Kutoh, E. (1987), "Identification and properties of a quinol oxidase super-complex composed of a bc1 complex and cytochrome oxidase in the thermophilic bacterium PS3." *J Biol Chem*, **262**(32): p. 15386-91.
- [144] Iwasaki, T., Wakagi, T., Isogai, Y., Iizuka, T. & Oshima, T. (1995), "Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. II. Characterization of the archaeal terminal oxidase subcomplexes and implication for the intramolecular electron transfer." *J Biol Chem*, **270**(52): p. 30893-901.
- [145] Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W. & Stuart, R.A. (2000), "The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supercomplex in yeast mitochondria." *J Biol Chem*, **275**(24): p. 18093-8.
- [146] Marques, I., Dencher, N.A., Videira, A. & Krause, F. (2007), "Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria." *Eukaryot Cell*, **6**(12): p. 2391-405.
- [147] Krause, F., Scheckhuber, C.Q., Werner, A., Rexroth, S., Reifschneider, N.H., Dencher, N.A. & Osiewacz, H.D. (2006), "OXPHOS Supercomplexes: respiration and life-span control in the aging model *Podospora anserina*." *Ann N Y Acad Sci*, **1067**: p. 106-15.
- [148] Eubel, H., Jansch, L. & Braun, H.P. (2003), "New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II." *Plant Physiol*, **133**(1): p. 274-86.
- [149] Krause, F., Reifschneider, N.H., Vocke, D., Seelert, H., Rexroth, S. & Dencher, N.A. (2004), "'Respirasome'-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach." *J Biol Chem*, **279**(46): p. 48369-75.
- [150] Eubel, H., Heinemeyer, J. & Braun, H.P. (2004), "Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria." *Plant Physiol*, **134**(4): p. 1450-9.
- [151] Schägger, H., de Coo, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C. & Brandt, U. (2004), "Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I." *J Biol Chem*, **279**(35): p. 36349-53.
- [152] Schon, E.A. & Dencher, N.A. (2009), "Heavy breathing: energy conversion by mitochondrial respiratory supercomplexes." *Cell Metab*, **9**(1): p. 1-3.
- [153] Schägger, H. & Pfeiffer, K. (2001), "The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes." *J Biol Chem*, **276**(41): p. 37861-7.
- [154] Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A. & Vonck, J. (2006), "Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes." *J Biol Chem*, **281**(22): p. 15370-5.
- [155] Bianchi, C., Genova, M.L., Parenti Castelli, G. & Lenaz, G. (2004), "The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis." *J Biol Chem*, **279**(35): p. 36562-9.



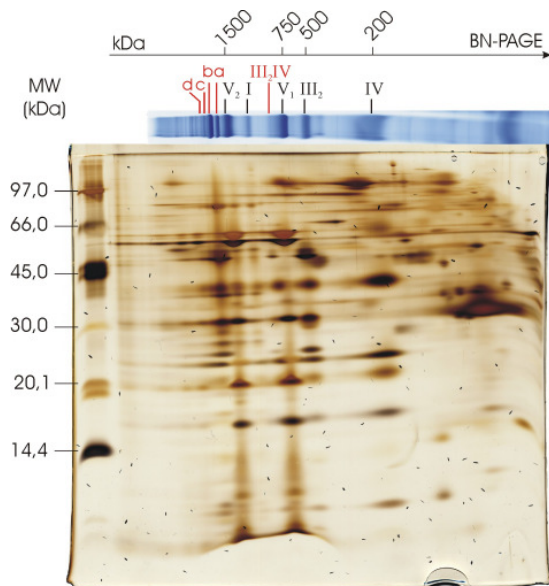
- 
- [156] Schäfer, E., Dencher, N.A., Vonck, J. & Parcej, D.N. (2007), "*Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I1III2IV1 from bovine heart mitochondria.*" *Biochemistry*, **46**(44): p. 12579-85.
- [157] Itoh, H., Komatsuda, A., Ohtani, H., Wakui, H., Imai, H., Sawada, K., Otaka, M., Ogura, M., Suzuki, A. & Hamada, F. (2002), "*Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration.*" *Eur J Biochem*, **269**(23): p. 5931-8.
- [158] Koll, H., Guiard, B., Rassow, J., Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W. & Hartl, F.U. (1992), "*Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space.*" *Cell*, **68**(6): p. 1163-75.
- [159] Calabrese, V., Mancuso, C., Ravagna, A., Perluigi, M., Cini, C., De Marco, C., Butterfield, D.A. & Stella, A.M. (2007), "*In vivo induction of heat shock proteins in the substantia nigra following L-DOPA administration is associated with increased activity of mitochondrial complex I and nitrosative stress in rats: regulation by glutathione redox state.*" *J Neurochem*, **101**(3): p. 709-17.
- [160] Hansen, J.J., Durr, A., Cournu-Rebeix, I., Georgopoulos, C., Ang, D., Nielsen, M.N., Davoine, C.S., Brice, A., Fontaine, B., Gregersen, N. & Bross, P. (2002), "*Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60.*" *Am J Hum Genet*, **70**(5): p. 1328-32.
- [161] Magen, D., Georgopoulos, C., Bross, P., Ang, D., Segev, Y., Goldsher, D., Nemirovski, A., Shahar, E., Ravid, S., Luder, A., Heno, B., Gershoni-Baruch, R., Skorecki, K. & Mandel, H. (2008), "*Mitochondrial hsp60 chaperonopathy causes an autosomal-recessive neurodegenerative disorder linked to brain hypomyelination and leukodystrophy.*" *Am J Hum Genet*, **83**(1): p. 30-42.
- [162] Mochel, F., Knight, M.A., Tong, W.H., Hernandez, D., Ayyad, K., Taivassalo, T., Andersen, P.M., Singleton, A., Rouault, T.A., Fischbeck, K.H. & Haller, R.G. (2008), "*Splice mutation in the iron-sulfur cluster scaffold protein ISCU causes myopathy with exercise intolerance.*" *Am J Hum Genet*, **82**(3): p. 652-60.
- [163] Olsson, A., Lind, L., Thornell, L.E. & Holmberg, M. (2008), "*Myopathy with lactic acidosis is linked to chromosome 12q23.3-24.11 and caused by an intron mutation in the ISCU gene resulting in a splicing defect.*" *Hum Mol Genet*, **17**(11): p. 1666-72.
- [164] Hatefi, Y. & Yamaguchi, M. (1996), "*Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a model for utilization of substrate binding energy for proton translocation.*" *FASEB J*, **10**(4): p. 444-52.
- [165] Battini, R., Ferrari, S., Kaczmarek, L., Calabretta, B., Chen, S.T. & Baserga, R. (1987), "*Molecular cloning of a cDNA for a human ADP/ATP carrier which is growth-regulated.*" *J Biol Chem*, **262**(9): p. 4355-9.
- [166] Brandolin, G., Dupont, Y. & Vignais, P.V. (1985), "*Substrate-induced modifications of the intrinsic fluorescence of the isolated adenine nucleotide carrier protein: demonstration of distinct conformational states.*" *Biochemistry*, **24**(8): p. 1991-7.
- [167] Gomez, L.A., Monette, J.S., Chavez, J.D., Maier, C.S. & Hagen, T.M. (2009), "*Supercomplexes of the mitochondrial electron transport chain decline in the aging rat heart.*" *Arch Biochem Biophys*, **490**(1): p. 30-5.
- [168] Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G. & Walker, J.E. (2000), "*The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 Å resolution.*" *Nat Struct Biol*, **7**(11): p. 1055-61.
- [169] Tatsuta, T., Model, K. & Langer, T. (2005), "*Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria.*" *Mol Biol Cell*, **16**(1): p. 248-59.
- [170] Wernicke, C., Hellmann, J., Zieba, B., Kuter, K., Ossowska, K., Frenzel, M., Dencher, N.A. & Rommelspacher, H. (2010), "*9-Methyl-beta-carboline has restorative effects in an animal model of Parkinson's disease.*" *Pharmacol Rep*, **62**(1): p. 35-53.

- 
- [171] Harper, M.E., Monemdjou, S., Ramsey, J.J. & Weindruch, R. (1998), "Age-related increase in mitochondrial proton leak and decrease in ATP turnover reactions in mouse hepatocytes." *Am J Physiol*, **275**(2 Pt 1): p. E197-206.
- [172] Lal, S.B., Ramsey, J.J., Monemdjou, S., Weindruch, R. & Harper, M.E. (2001), "Effects of caloric restriction on skeletal muscle mitochondrial proton leak in aging rats." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **56**(3): p. B116-22.
- [173] Hekimi, S., Lapointe, J. & Wen, Y. (2011), "Taking a "good" look at free radicals in the aging process." *Trends Cell Biol*, **21**(10): p. 569-76.
- [174] O'Connell, K. & Ohlendieck, K. (2009), "Proteomic DIGE analysis of the mitochondria-enriched fraction from aged rat skeletal muscle." *Proteomics*, **9**(24): p. 5509-24.
- [175] Capitanio, D., Vasso, M., Fania, C., Moriggi, M., Vigano, A., Procacci, P., Magnaghi, V. & Gelfi, C. (2009), "Comparative proteomic profile of rat sciatic nerve and gastrocnemius muscle tissues in ageing by 2-D DIGE." *Proteomics*, **9**(7): p. 2004-20.
- [176] Lombardi, A., Silvestri, E., Cioffi, F., Senese, R., Lanni, A., Goglia, F., de Lange, P. & Moreno, M. (2009), "Defining the transcriptomic and proteomic profiles of rat ageing skeletal muscle by the use of a cDNA array, 2D- and Blue native-PAGE approach." *J Proteomics*, **72**(4): p. 708-21.
- [177] Groebe, K., Krause, F., Kunstmann, B., Unterluggauer, H., Reifschneider, N.H., Scheckhuber, C.Q., Sastri, C., Stegmann, W., Wozny, W., Schwall, G.P., Poznanovic, S., Dencher, N.A., Jansen-Durr, P., Osiewacz, H.D. & Schratzenholz, A. (2007), "Differential proteomic profiling of mitochondria from *Podospira anserina*, rat and human reveals distinct patterns of age-related oxidative changes." *Exp Gerontol*, **42**(9): p. 887-98.
- [178] Bloeck, F. (2011), "Age-Associated Changes in the Mitochondrial Proteome of the Annual Killifish *Nothobranchius furzeri*", Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt
- [179] Schwassmann, H.J., Rexroth, S., Seelert, H. & Dencher, N.A. (2007), "Metabolism controls dimerization of the chloroplast FoF1 ATP synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*." *FEBS Lett*, **581**(7): p. 1391-6.
- [180] Seelert, H. & Dencher, N.A. (2011), "ATP synthase superassemblies in animals and plants: two or more are better." *Biochim Biophys Acta*, **1807**(9): p. 1185-97.
- [181] Gavin, P.D., Prescott, M., Luff, S.E. & Devenish, R.J. (2004), "Cross-linking ATP synthase complexes in vivo eliminates mitochondrial cristae." *J Cell Sci*, **117**(Pt 11): p. 2333-43.
- [182] Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S. & Garcia, J.J. (2005), "Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(35): p. 12356-8.
- [183] Dudkina, N.V., Sunderhaus, S., Braun, H.P. & Boekema, E.J. (2006), "Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria." *FEBS Lett*, **580**(14): p. 3427-32.
- [184] Drew, B., Phaneuf, S., Dirks, A., Selman, C., Gredilla, R., Lezza, A., Barja, G. & Leeuwenburgh, C. (2003), "Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **284**(2): p. R474-80.
- [185] Sreekumar, R., Unnikrishnan, J., Fu, A., Nygren, J., Short, K.R., Schimke, J., Barazzoni, R. & Nair, K.S. (2002), "Effects of caloric restriction on mitochondrial function and gene transcripts in rat muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **283**(1): p. E38-43.
- [186] Conley, K.E., Jubrias, S.A. & Esselman, P.C. (2000), "Oxidative capacity and ageing in human muscle." *J Physiol*, **526 Pt 1**: p. 203-10.

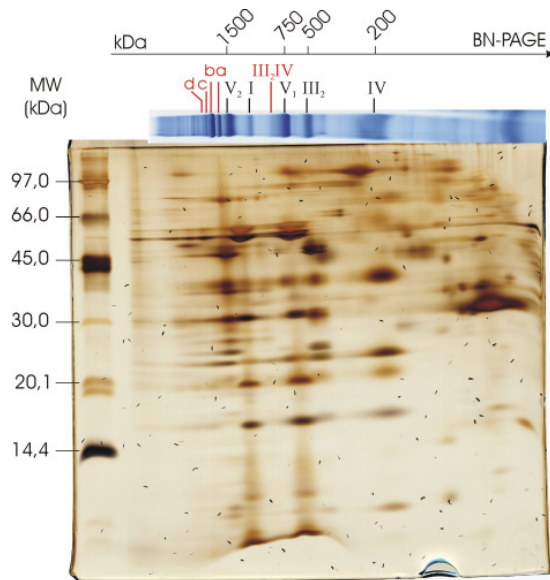
- 
- [187] Kim, J.H., Shrago, E. & Elson, C.E. (1988), "*Age-related changes in respiration coupled to phosphorylation. II. Cardiac mitochondria.*" Mech Ageing Dev, **46**(1-3): p. 279-90.
- [188] Calabrese, E.J. & Baldwin, L.A. (2003), "*Hormesis: the dose-response revolution.*" Annu Rev Pharmacol Toxicol, **43**: p. 175-97.
- [189] Chung, L. & Ng, Y.C. (2006), "*Age-related alterations in expression of apoptosis regulatory proteins and heat shock proteins in rat skeletal muscle.*" Biochim Biophys Acta, **1762**(1): p. 103-9.
- [190] Yarian, C.S. & Sohal, R.S. (2005), "*In the aging housefly aconitase is the only citric acid cycle enzyme to decline significantly.*" J Bioenerg Biomembr, **37**(2): p. 91-6.
- [191] Yarian, C.S., Toroser, D. & Sohal, R.S. (2006), "*Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice.*" Mech Ageing Dev, **127**(1): p. 79-84.
- [192] Yarian, C.S., Rebrin, I. & Sohal, R.S. (2005), "*Aconitase and ATP synthase are targets of malondialdehyde modification and undergo an age-related decrease in activity in mouse heart mitochondria.*" Biochem Biophys Res Commun, **330**(1): p. 151-6.
- [193] Coates, P.J., Nenutil, R., McGregor, A., Picksley, S.M., Crouch, D.H., Hall, P.A. & Wright, E.G. (2001), "*Mammalian prohibitin proteins respond to mitochondrial stress and decrease during cellular senescence.*" Exp Cell Res, **265**(2): p. 262-73.
- [194] Sievers, C. (2007), "*Prohibitin proteins: mitochondrial chaperones and regulators of adhesion*", Dissertation, Freie Universität Berlin
- [195] Chang, J., Cornell, J.E., Van Remmen, H., Hakala, K., Ward, W.F. & Richardson, A. (2007), "*Effect of aging and caloric restriction on the mitochondrial proteome.*" J Gerontol A Biol Sci Med Sci, **62**(3): p. 223-34.

## Anhang

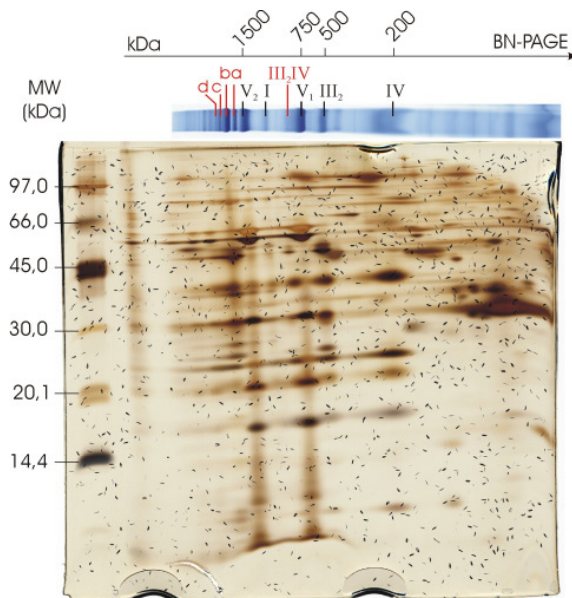
### Gelbilder der subsarcolemmalen Mitochondrien aus Herz



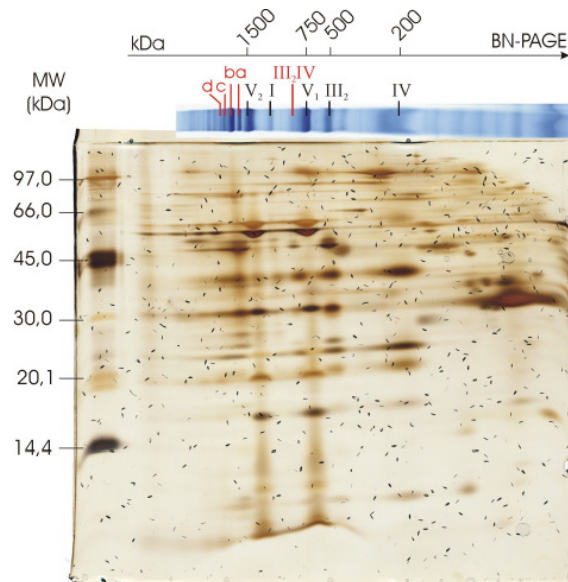
**Abb. A1:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YAL1, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



**Abb. A2:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YAL1, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

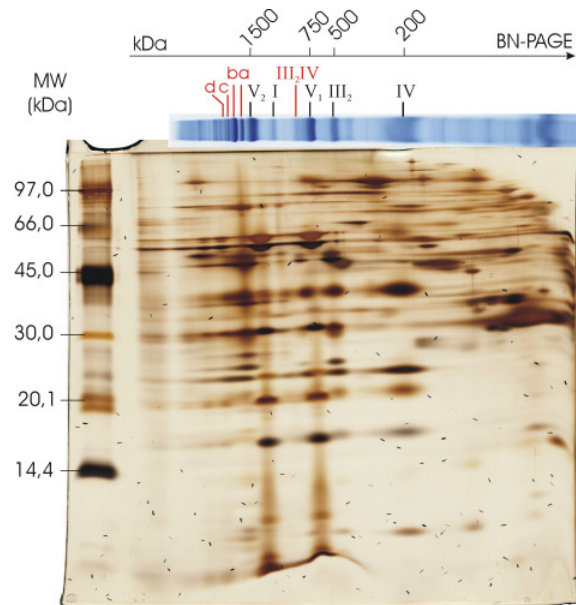


**Abb. A3:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YAL2, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

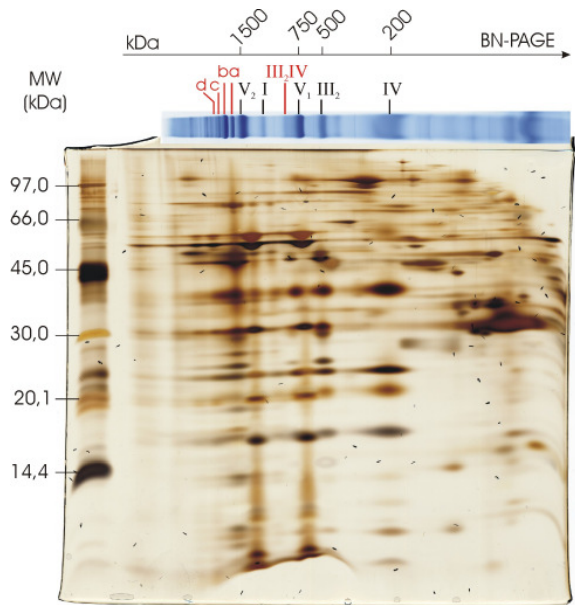


**Abb. A4:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YAL2, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

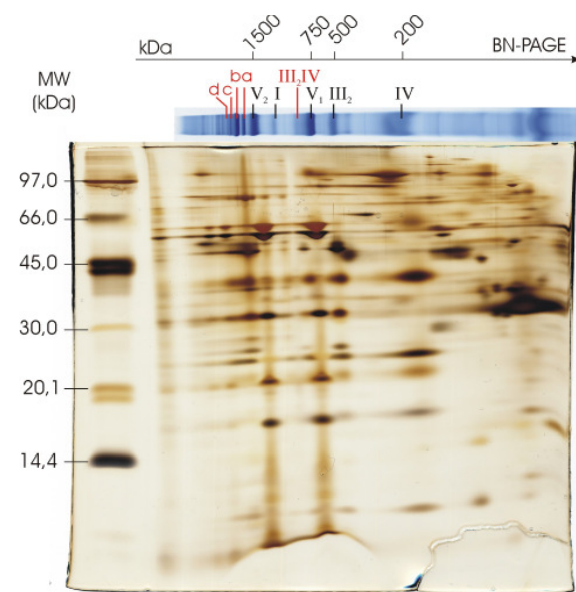




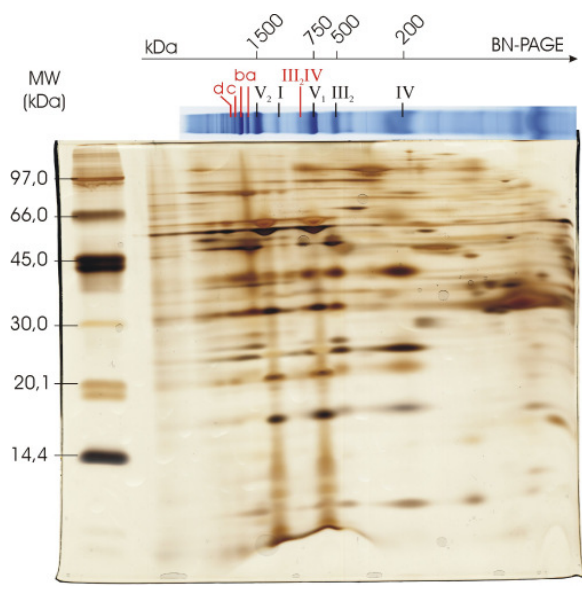
**Abb. A5:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YAL3, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



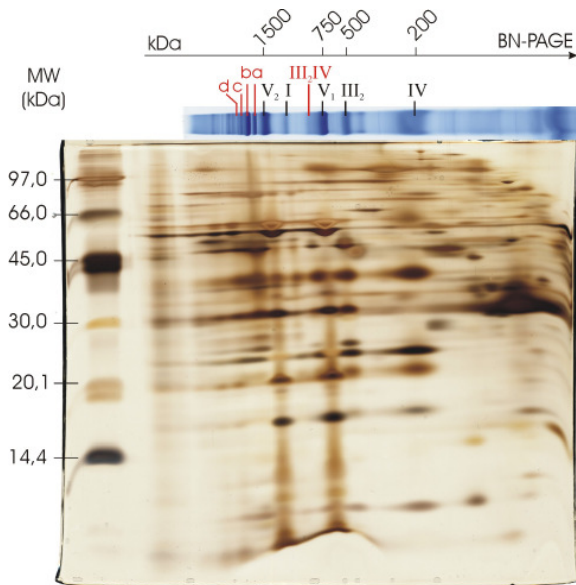
**Abb. A6:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YAL3, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



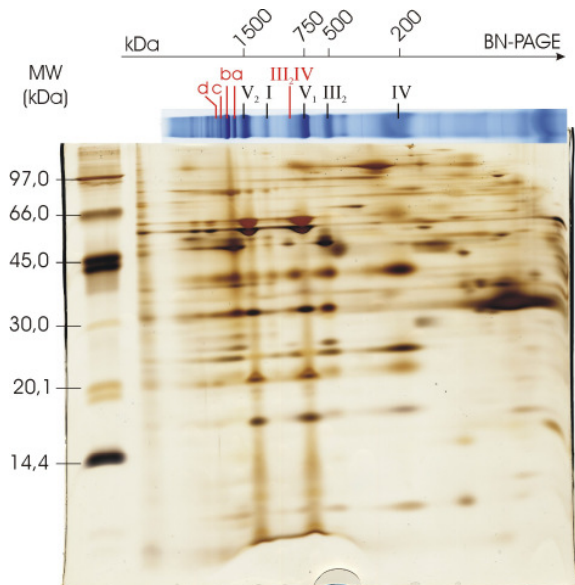
**Abb. A7:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YAL4, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



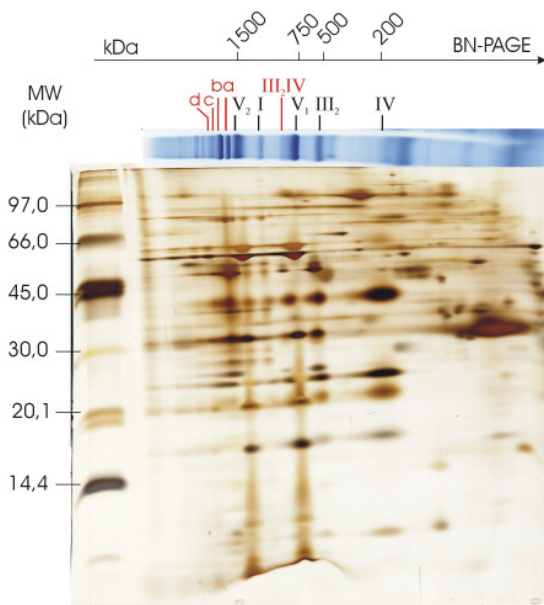
**Abb. A8:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YAL4, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



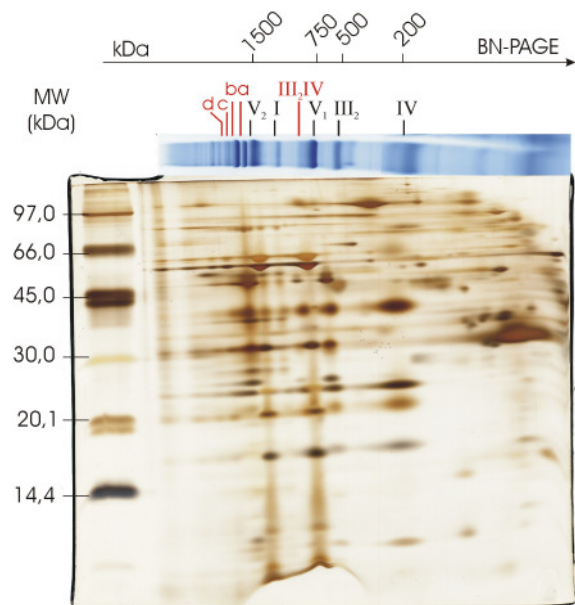
**Abb. A9:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YAL5, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



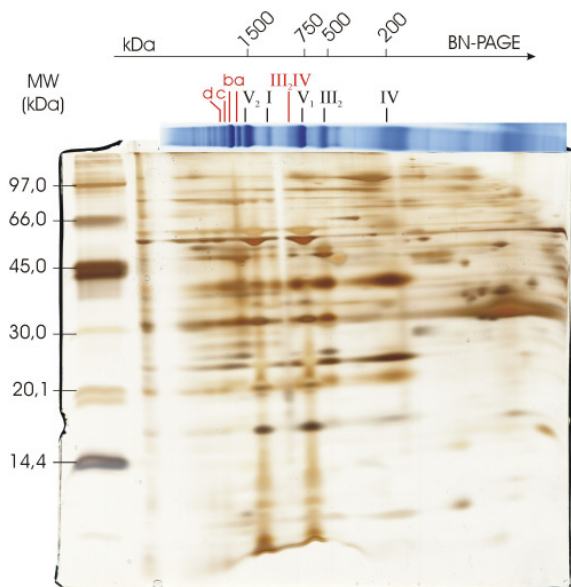
**Abb. A10:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YAL5, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



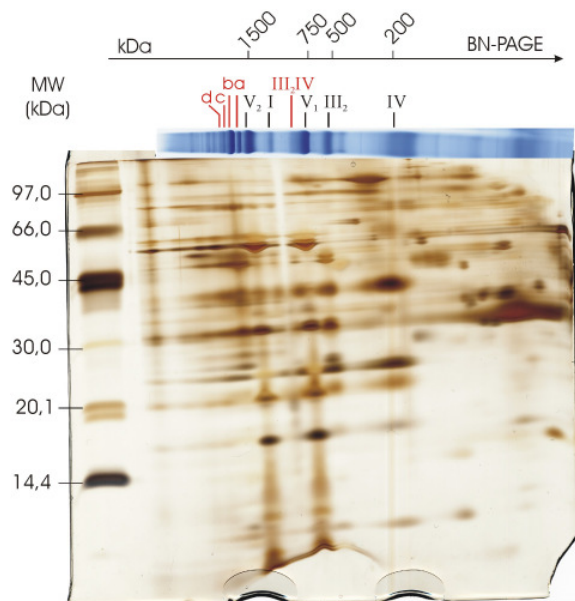
**Abb. A11:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YCR1, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



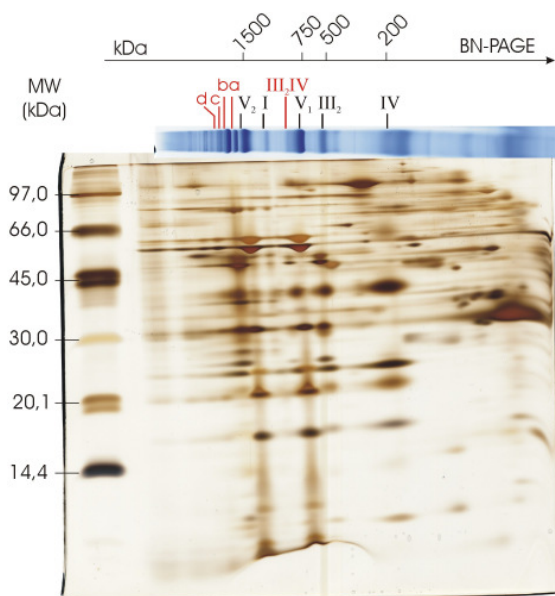
**Abb. A12:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YCR1, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



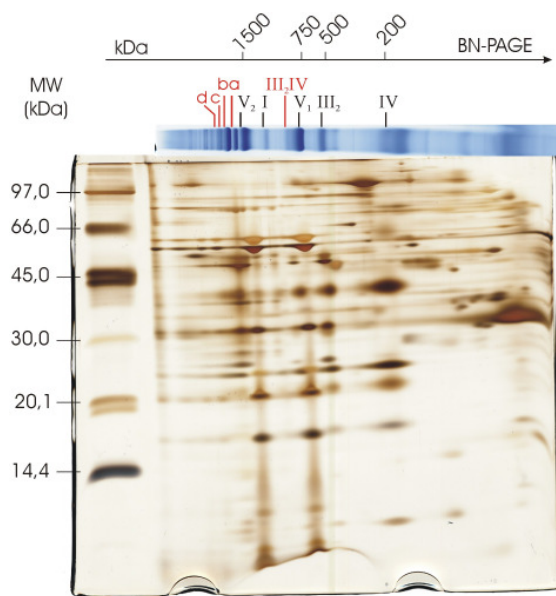
**Abb. A13:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YCR2, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



**Abb. A14:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YCR2, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

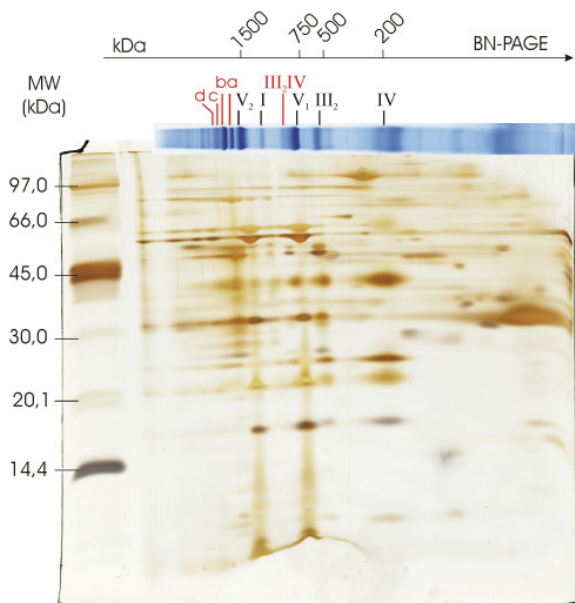


**Abb. A15:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YCR3, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

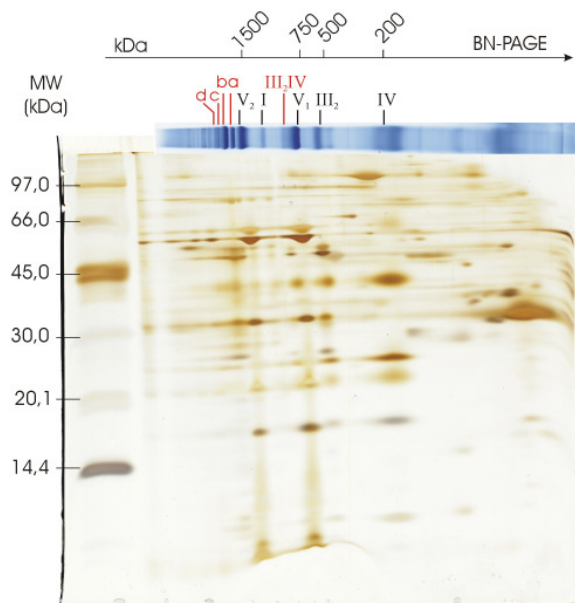


**Abb. A16:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YCR3, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

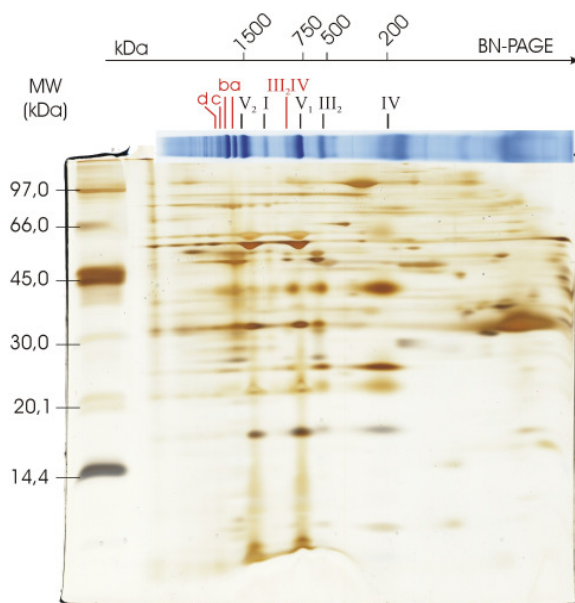




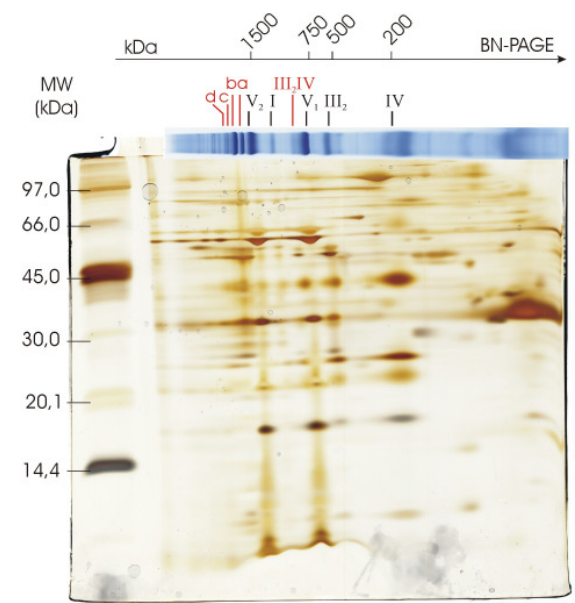
**Abb. A17:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YCR4, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



**Abb. A18:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YCR4, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

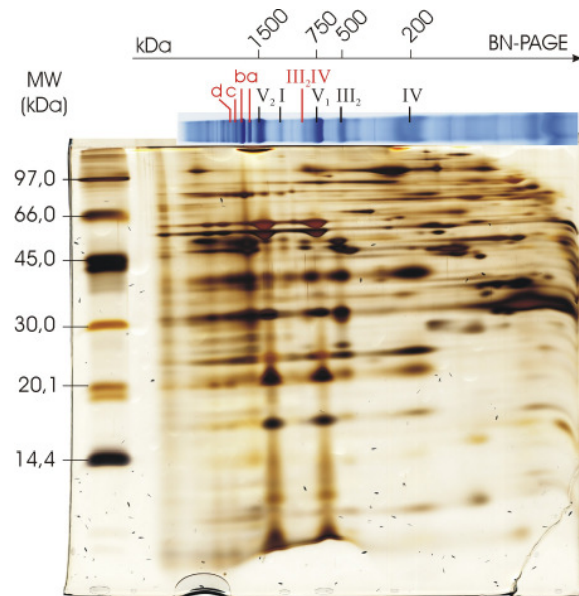


**Abb. A19:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YCR5, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

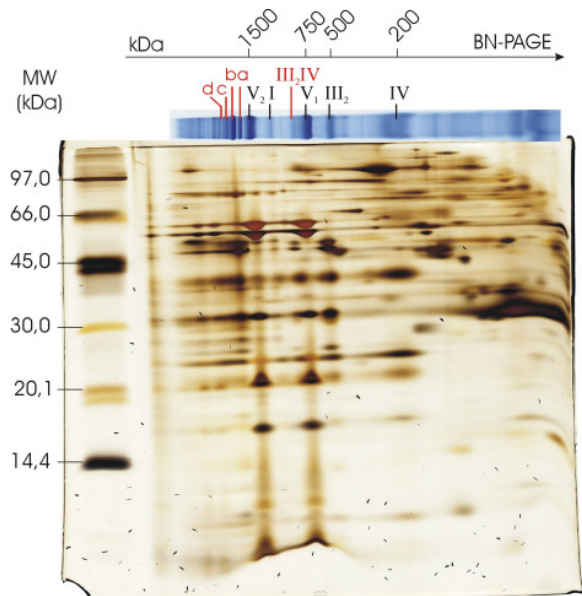


**Abb. A20:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier YCR5, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

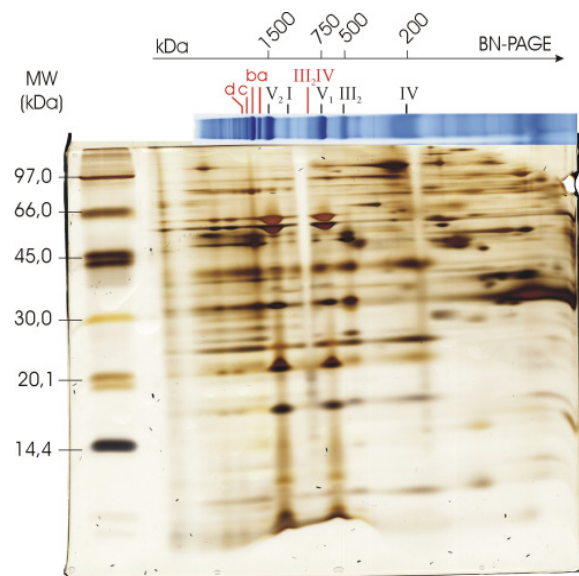




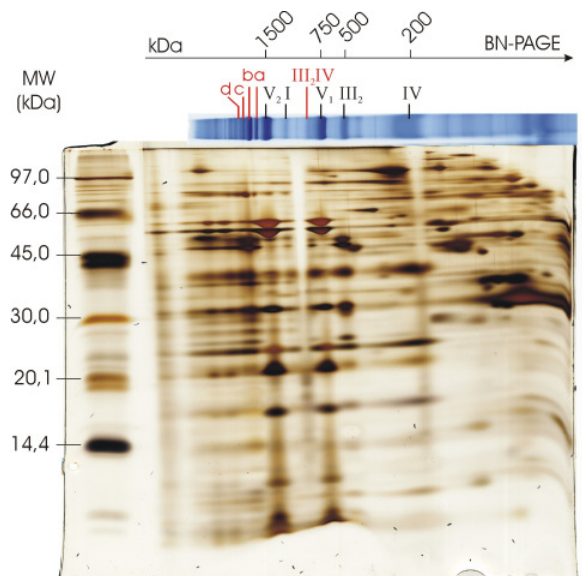
**Abb. A21:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OAL1, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



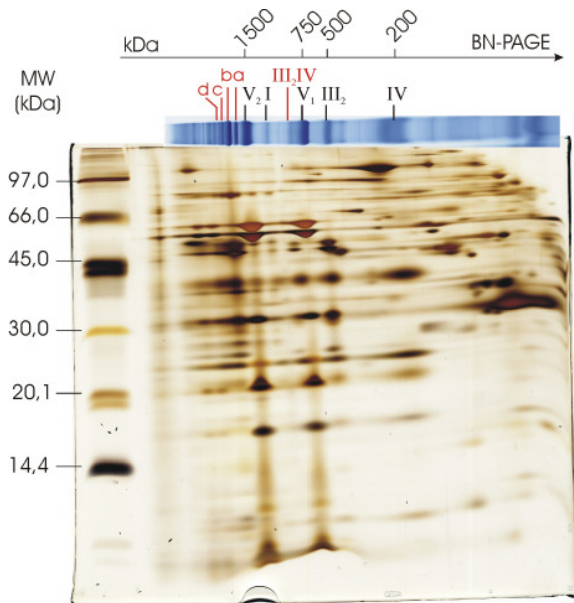
**Abb. A22:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OAL1, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



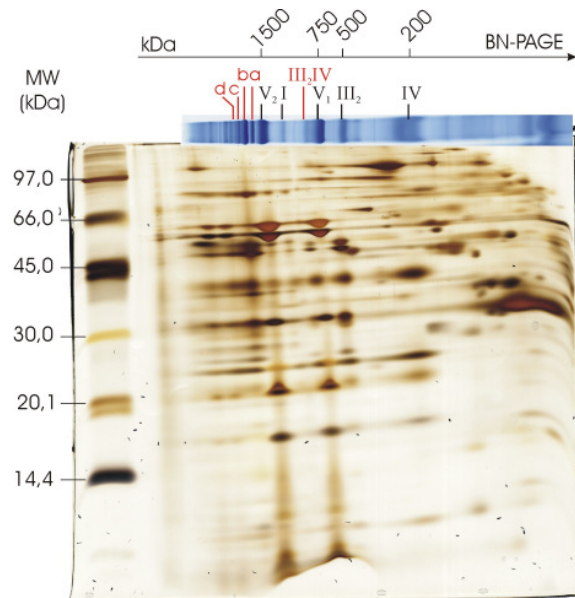
**Abb. A23:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OAL2, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



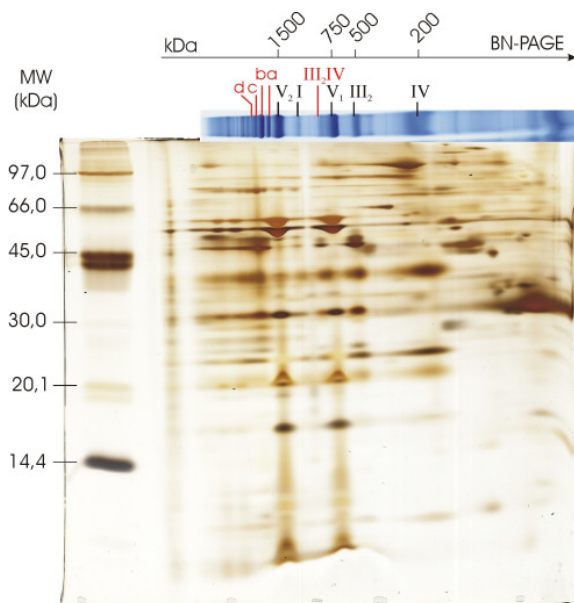
**Abb. A24:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OAL2, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



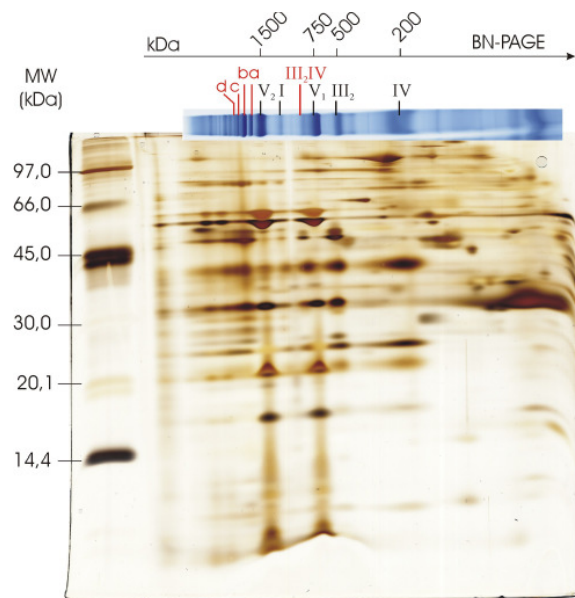
**Abb. A25:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OAL3, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



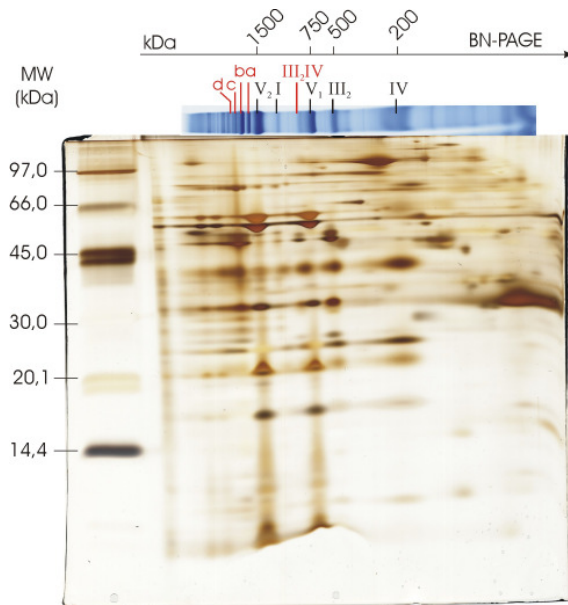
**Abb. A26:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OAL3, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



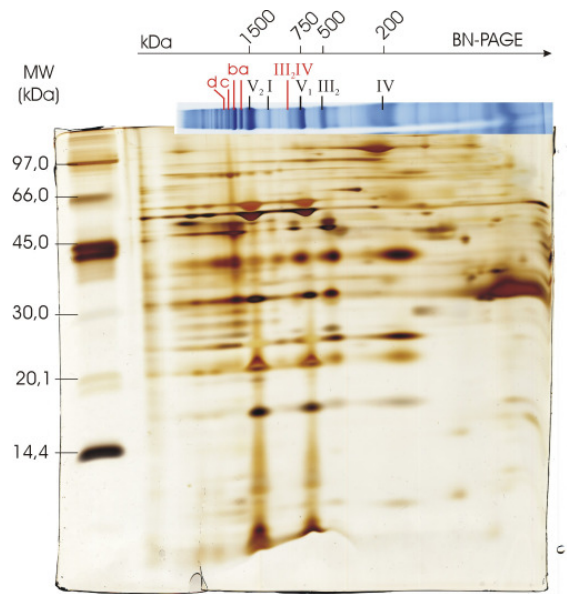
**Abb. A27:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OAL4, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



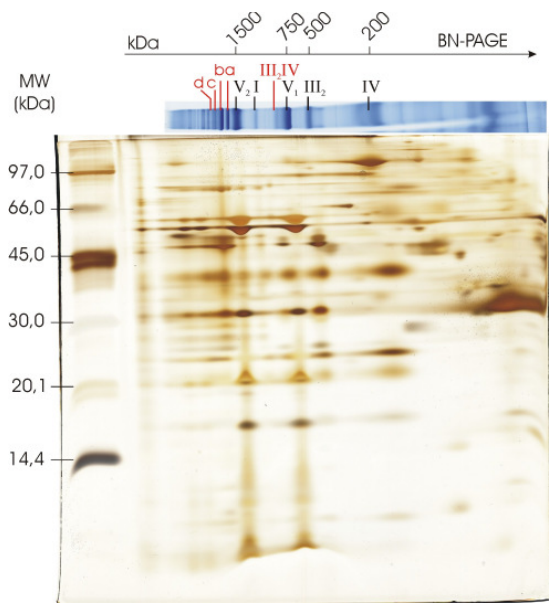
**Abb. A28:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OAL4, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



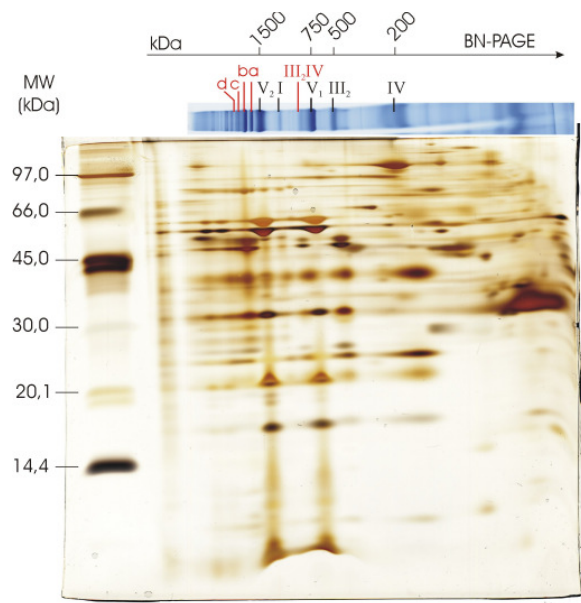
**Abb. A29:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OAL5, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



**Abb. A30:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OAL5, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

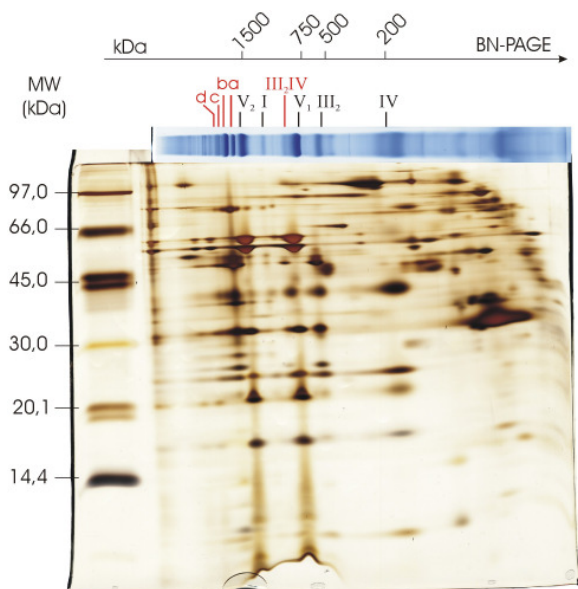


**Abb. A31:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OAL6, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

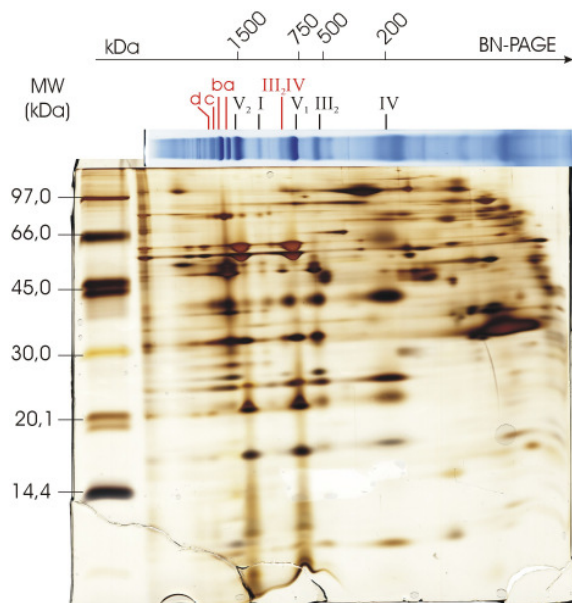


**Abb. A32:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OAL6, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

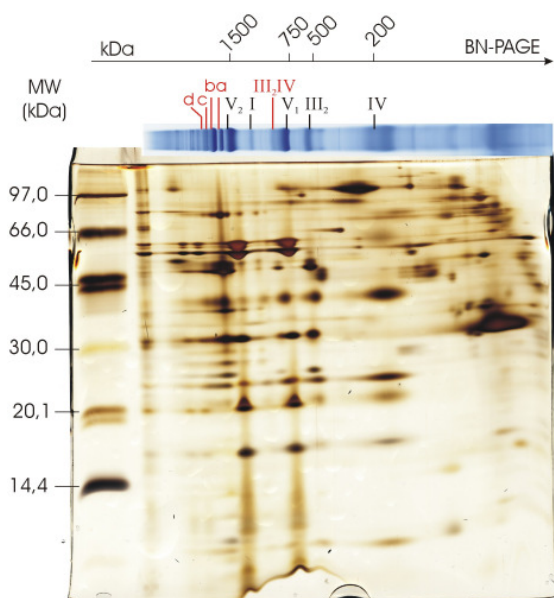




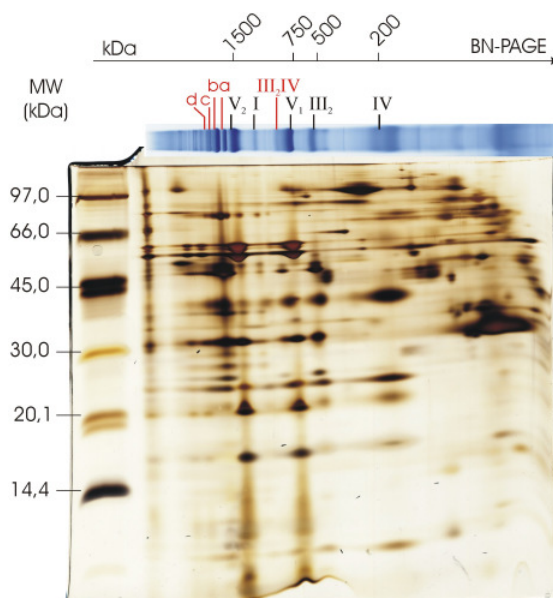
**Abb. A33:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OCR1, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



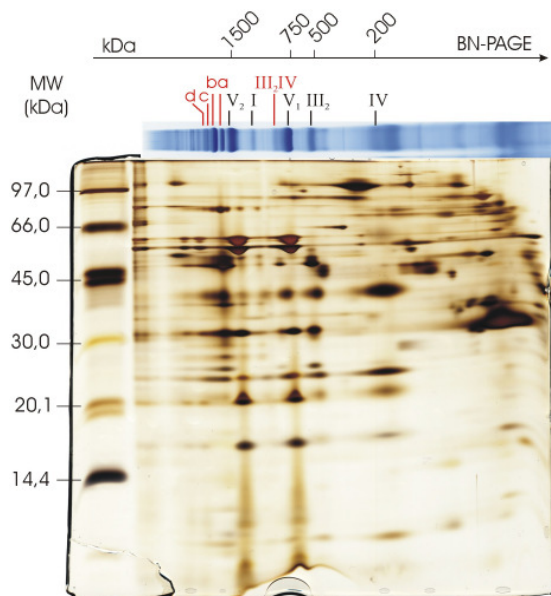
**Abb. A34:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OCR1, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



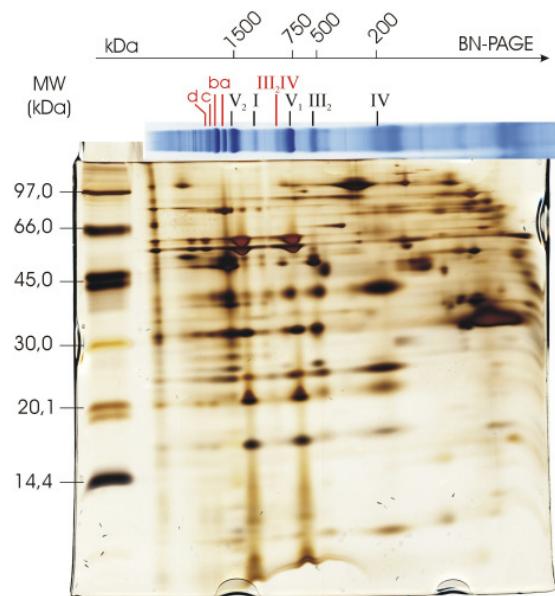
**Abb. A35:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OCR2, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



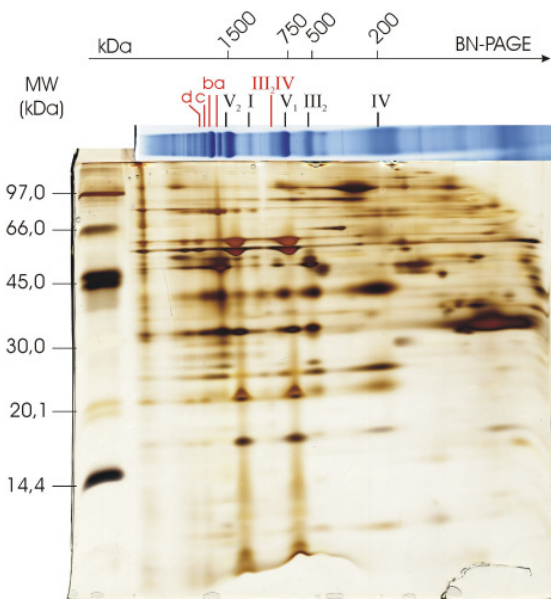
**Abb. A36:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OCR2, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



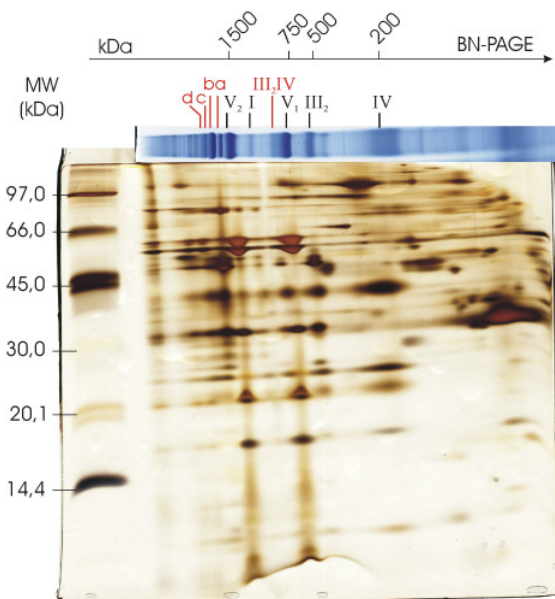
**Abb. A37:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OCR3, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



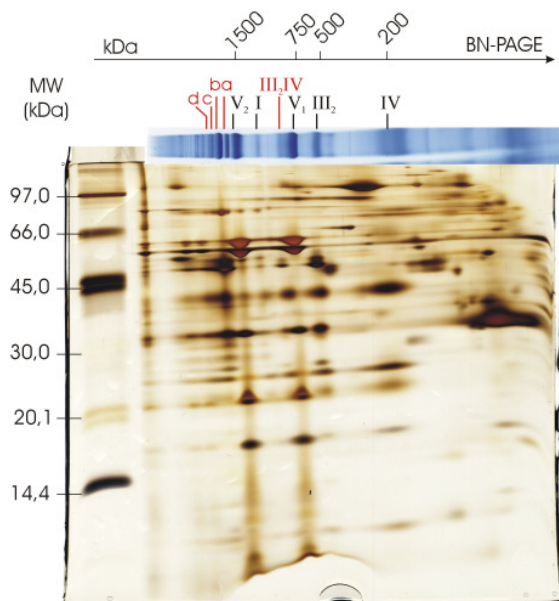
**Abb. A38:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OCR3, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



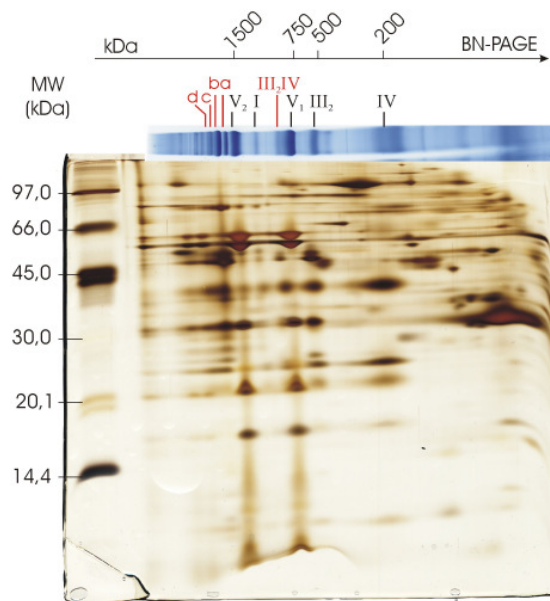
**Abb. A39:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OCR4, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



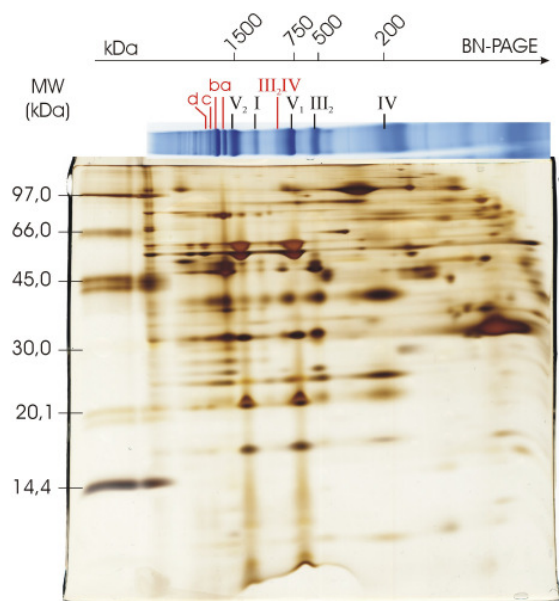
**Abb. A40:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OCR4, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



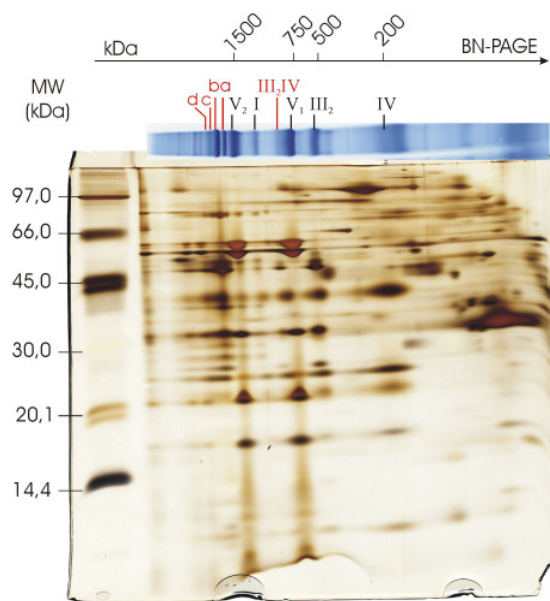
**Abb. A41:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OCR5, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



**Abb. A42:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OCR5, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



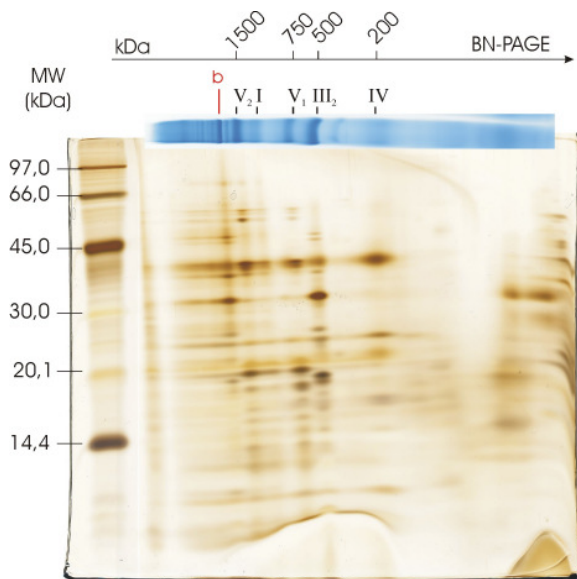
**Abb. A43:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OCR6, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



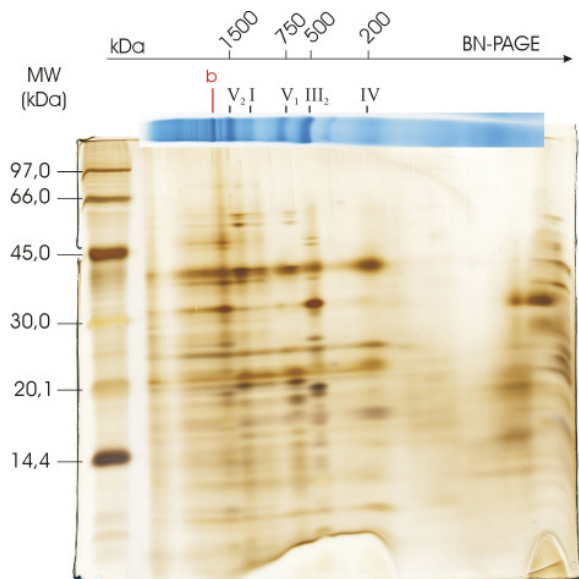
**Abb. A44:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel von Tier OCR6, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



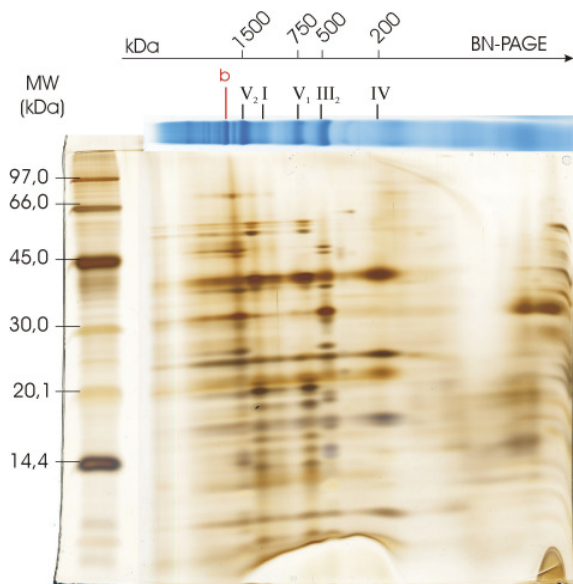
## Gelbilder der interfibrillären Mitochondrien aus Herz



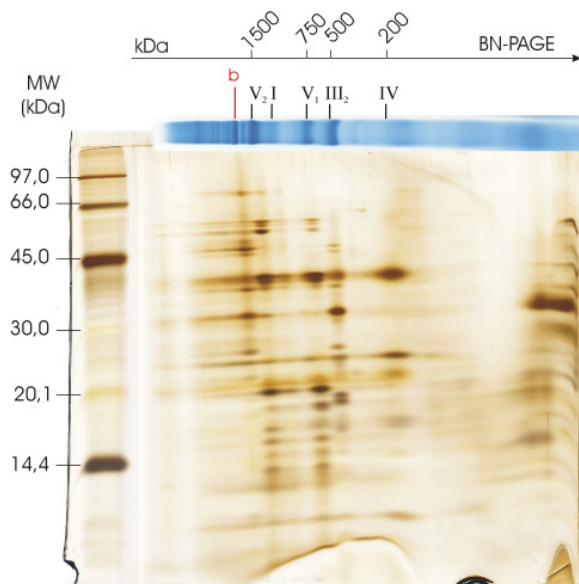
**Abb. A45:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des YAL-Pools, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



**Abb. A46:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des YAL-Pools, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

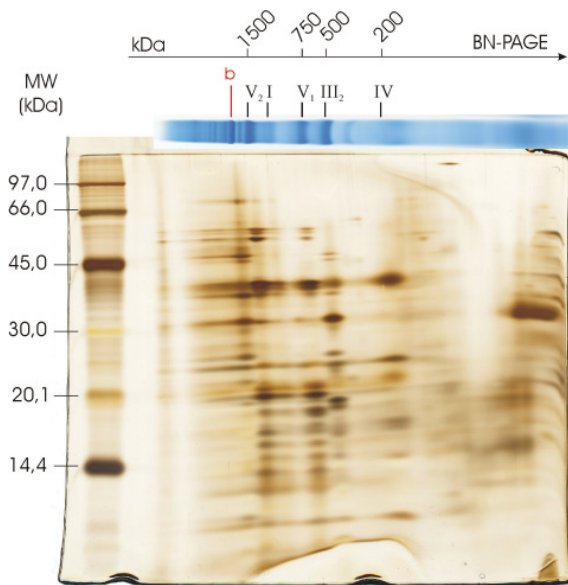


**Abb. A47:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des YCR-Pools, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

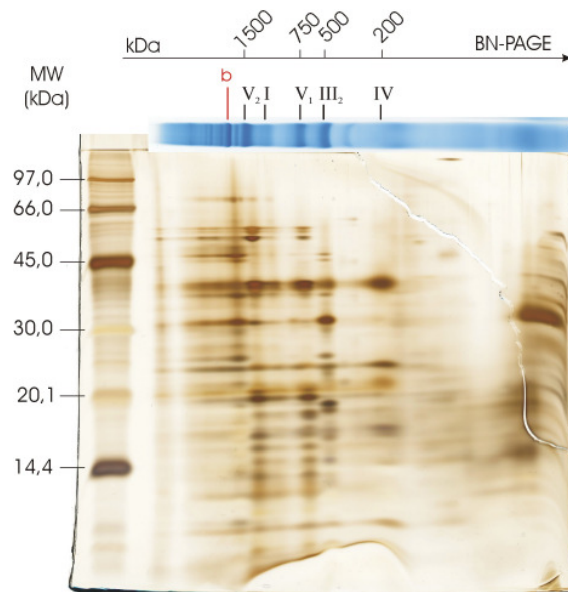


**Abb. A48:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des YCR-Pools, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

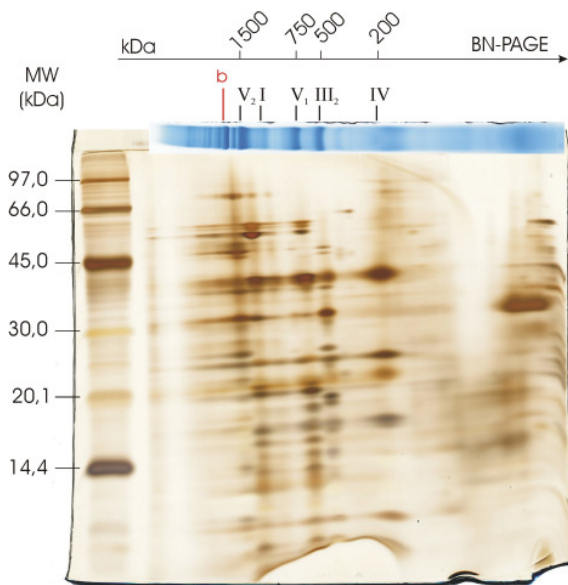




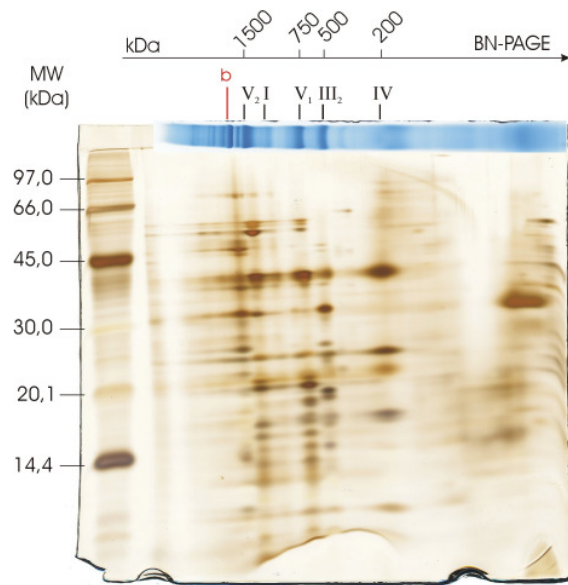
**Abb. A49:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des OAL-Pools, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).



**Abb. A50:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des OAL-Pools, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

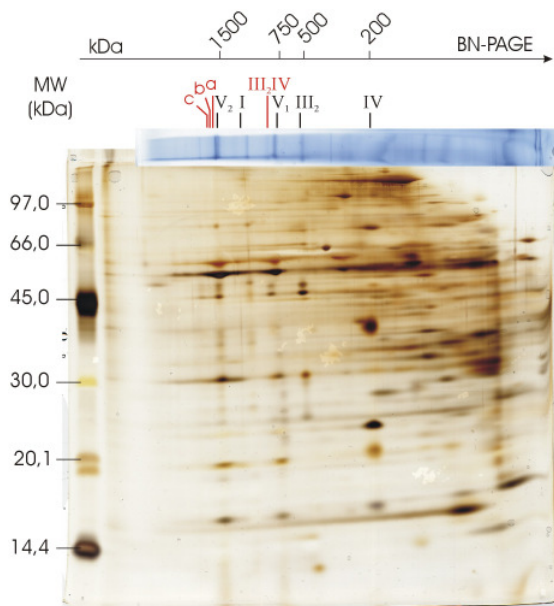


**Abb. A51:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des OCR-Pools, Replik 1 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

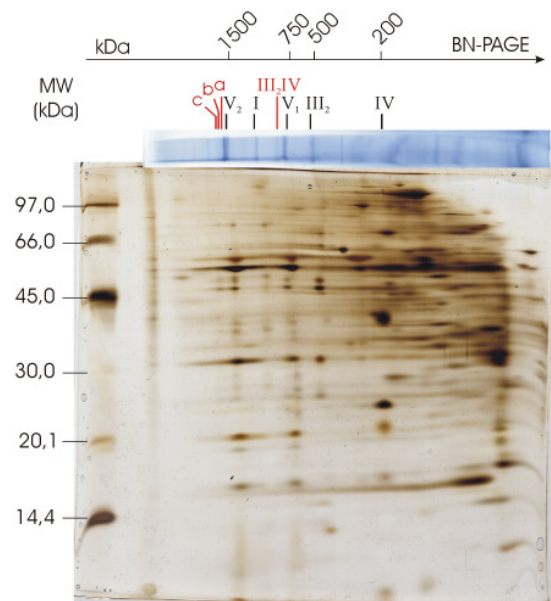


**Abb. A52:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des OCR-Pools, Replik 2 von 2. Aufgetragen wurden 110 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 4:1 (w/w).

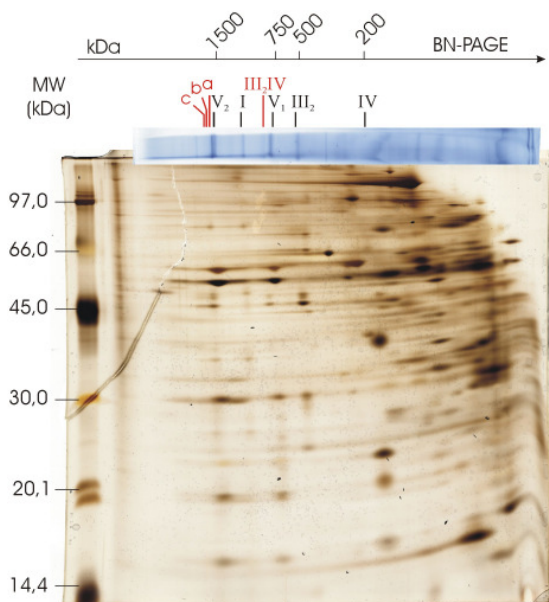
## Gelbilder der Mitochondrien aus Leber



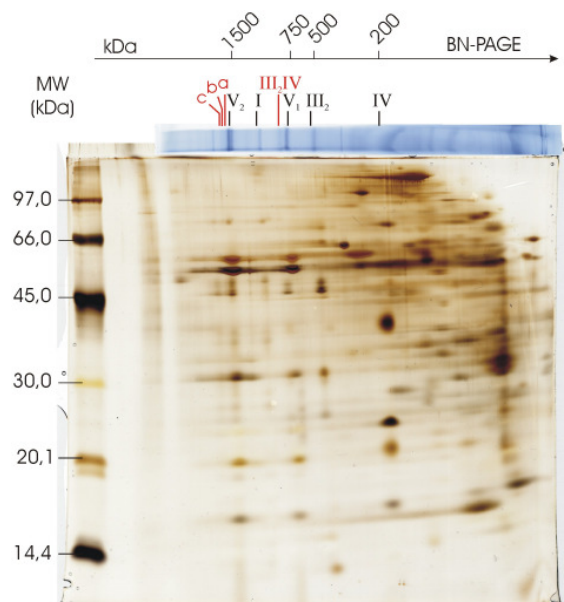
**Abb. A53:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des YAL-Pools, Replik 1 von 3. Aufgetragen wurden 120 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 8:1 (w/w).



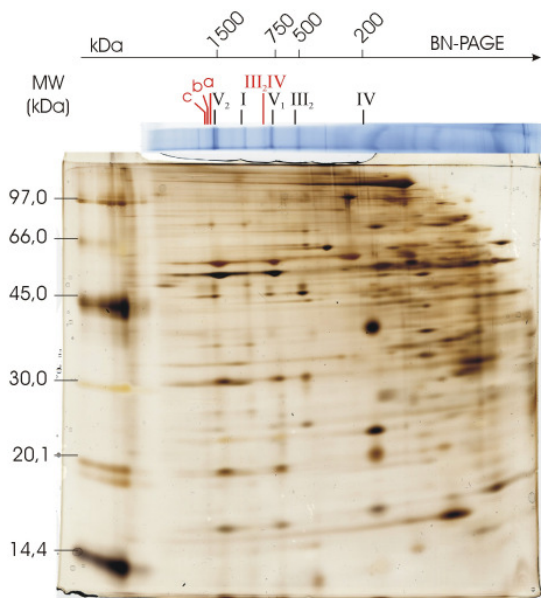
**Abb. A54:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des YAL-Pools, Replik 2 von 3. Aufgetragen wurden 120 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 8:1 (w/w).



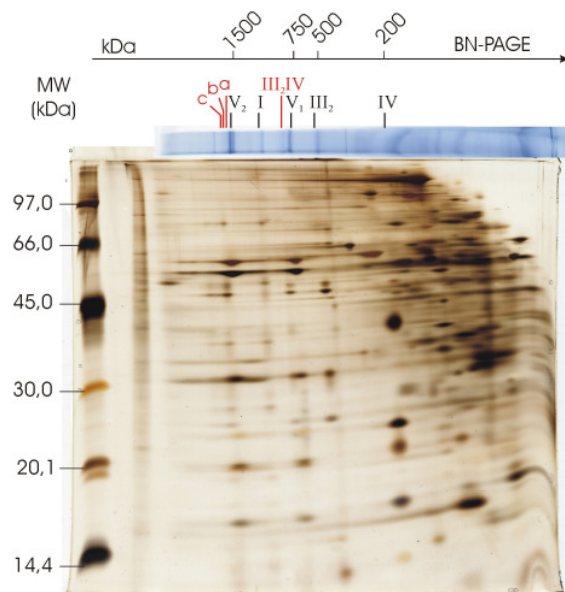
**Abb. A55:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des YAL-Pools, Replik 3 von 3. Aufgetragen wurden 120 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 8:1 (w/w).



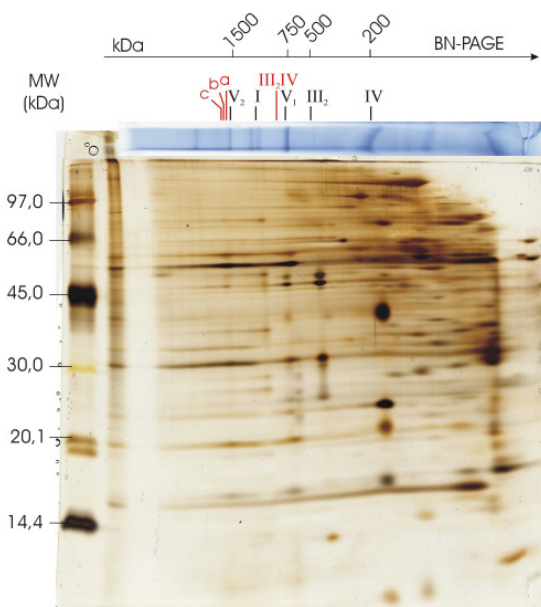
**Abb. A56:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des OAL-Pools, Replik 1 von 3. Aufgetragen wurden 120 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 8:1 (w/w).



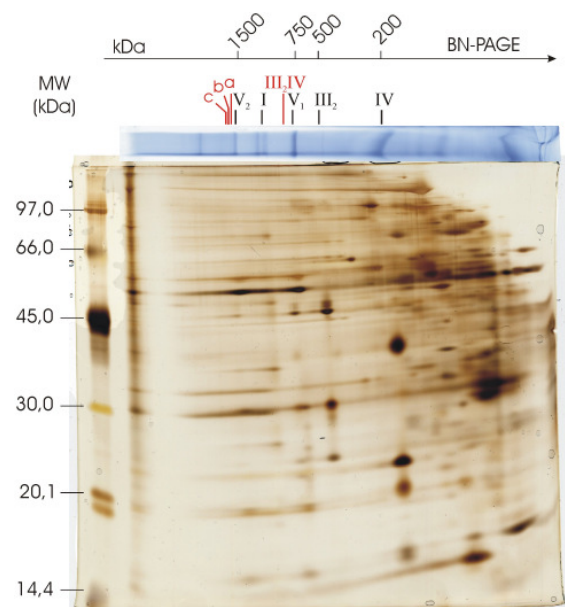
**Abb. A57:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des OAL-Pools, Replik 2 von 3. Aufgetragen wurden 120 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 8:1 (w/w).



**Abb. A58:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des OAL-Pools, Replik 3 von 3. Aufgetragen wurden 120 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 8:1 (w/w).

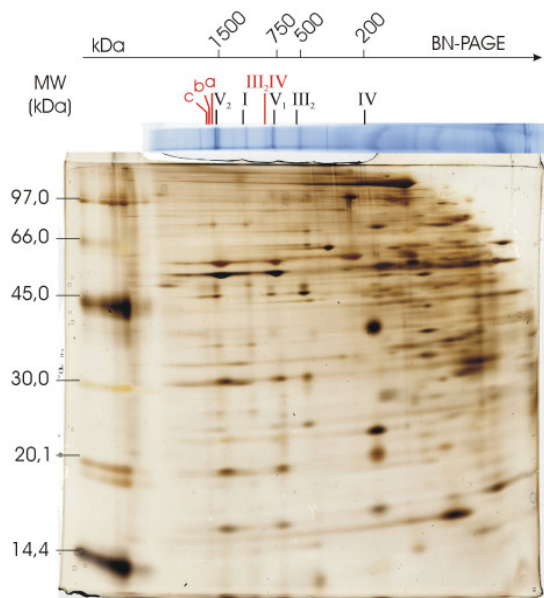


**Abb. A59:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des OCR (1)-Pools, Replik 1 von 3. Aufgetragen wurden 120 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 8:1 (w/w).

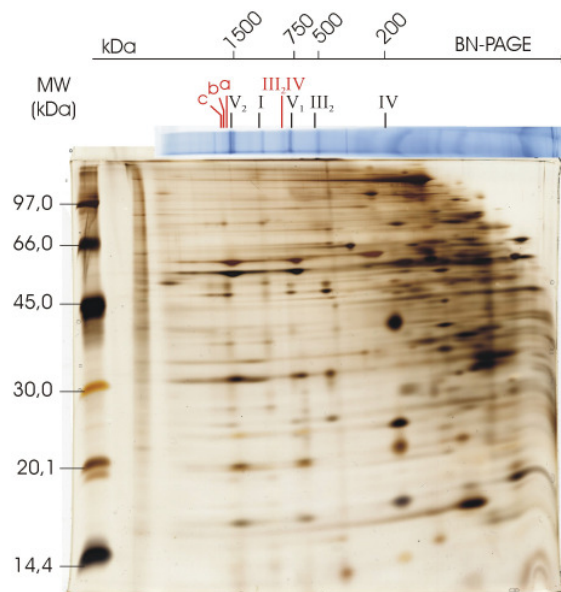


**Abb. A60:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des OCR (1)-Pools, Replik 2 von 3. Aufgetragen wurden 120 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 8:1 (w/w).

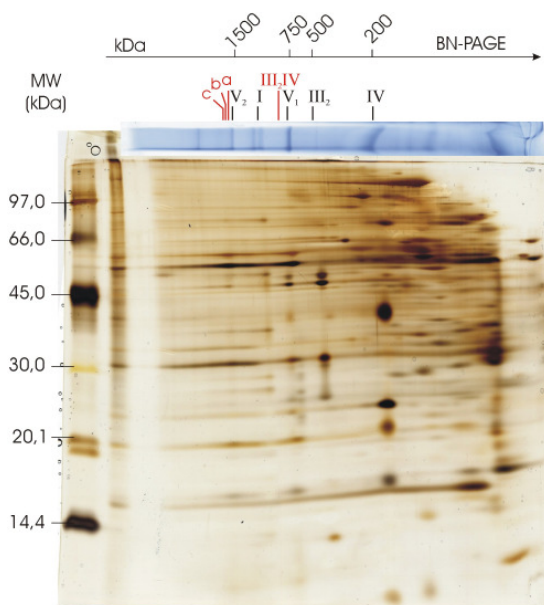




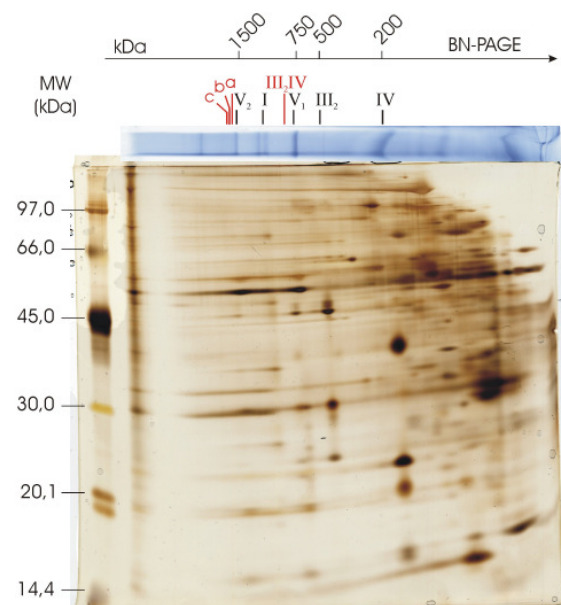
**Abb. A61:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des OCR (1)-Pools, Replik 3 von 3. Aufgetragen wurden 120 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 8:1 (w/w).



**Abb. A62:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des OCR (2)-Pools, Replik 1 von 3. Aufgetragen wurden 120 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 8:1 (w/w).



**Abb. A63:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des OCR (2)-Pools, Replik 2 von 3. Aufgetragen wurden 120 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 8:1 (w/w).



**Abb. A64:** Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des OCR (2)-Pools, Replik 3 von 3. Aufgetragen wurden 120 µg Protein vor Solubilisierung, das Detergens/Protein-Verhältnis beträgt 8:1 (w/w).

---

Die 44 Gelbilder, die der Quantifizierung der Proteine aus Hirnmitochondrien zugrunde liegen, sind in der Diplomarbeit von Michaela Söhn gezeigt<sup>[91]</sup>.







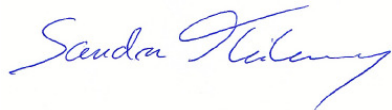
---

Sandra Cornelia Thilmany  
Seeweg 16  
63128 Dietzenbach

Dietzenbach, den 13.03.2013

### **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.



---

Sandra Cornelia Thilmany



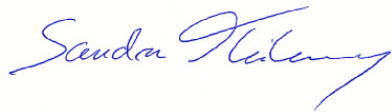
---

Sandra Cornelia Thilmany  
Seeweg 16  
63128 Dietzenbach

Dietzenbach, den 13.03.2013

### **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.



---

Sandra Cornelia Thilmany



---

## Lebenslauf

---

### Persönliche Daten

Name	Sandra Cornelia Thilmany
Adresse	Seeweg 16 63128 Dietzenbach
Geburtsdatum	27.05.1982
Geburtsort	Offenbach am Main
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Akademischer Werdegang

Mai 2008 bis März 2013	Promotion im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Darmstadt im Arbeitskreis Physikalische Biochemie von Prof. Dr. N. A. Dencher
Juli 2007 bis April 2008	Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Darmstadt im Arbeitskreis Physikalische Biochemie von Prof. Dr. N. A. Dencher Titel der Arbeit: <i>Effekte des Alterns und der kurzzeitigen Kalorienrestriktion auf das mitochondriale Proteom der Rattenleber</i>
Oktober 2002 bis April 2008	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt

### Schulbildung

August 1998 bis Juni 2001	Oberstufe, Oswald-von-Nell-Breuning-Schule, Rödermark / Ober-Roden
August 1992 bis Juli 1998	Gymnasialer Zweig, Ernst-Reuter-Schule, Dietzenbach
August 1988 bis Juli 1992	Grundschule, Aue-Schule, Dietzenbach

Dietzenbach, den 13.03.2013



---

Sandra Cornelia Thilmany

---